

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Caracterización de la Actividad de Transporte
por las Bombas de Ca^{2+} en Túbulos Transversos
y Retículo Sarcoplásmico de Fibras Musculares
Esqueléticas de Conejos Adaptados al Ejercicio
y durante la Fatiga**

TESIS

Que para obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

la Médica Veterinaria y Zootecnista
Viola Maria Becker Schneck

Tutora:

Dra. Alicia Ortega Aguilar

Cotutores:

Dr. Edmundo Chávez Cosío

Dr. Rafael Villalobos

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

**La presente tesis fue realizada en el laboratorio de la Dra. Alicia Ortega
Aguilar, del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a las siguientes personas:

mi tutora Alicia Ortega

mi esposo Carlos Prieto

mis hermanos Rüdiger y Michael

mis padres Günter y Roswitha Becker,

además de Ángel Zarain-Herzberg,

Rocío Álvarez y

mi amiga Cecilia Sánchez

por el apoyo que me ha brindado cada uno de ellos.

También agradezco a mis sinodales su cuidadosa revisión y sus valiosas

sugerencias para mejorar este trabajo.

**Caracterización de la Actividad de Transporte por las Bombas de Ca^{2+} en
Túbulos Transversos y Retículo Sarcoplásmico de Fibras Musculares
Esqueléticas de Conejos Adaptados al Ejercicio y durante la Fatiga**

Miembros del Jurado en la Presentación de la Tesis:

Dr. Edmundo Chávez

Dra. Alicia Ortega Aguilar

Dr. Ángel Zaráin-Herzberg

Dr. Agustín Guerrero Molina

Dr. Jaime Mas Oliva

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Dr. Gerardo Gamba

Abreviaturas

| | |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| AEC | Acoplamiento excitación-contracción |
| [Ca²⁺]_i | Concentración citoplasmática de Ca ²⁺ |
| CaM | Calmodulina |
| CDB | Calorimetría diferencial de barrido |
| CT | Cisternas terminales |
| DHP | Dihidropiridina |
| FL | Fosfolamban |
| PM | Peso molecular |
| PMCA | ATPasa de Ca ²⁺ de membrana plasmática |
| RDHP | Receptor de dihidropiridina |
| RS | Retículo sarcoplásmico |
| RyR | Receptor de rianodina |
| RyR1 | Isoforma predominante de músculo esquelético |
| SERCA | Ca ²⁺ -ATPasa de retículo sarcoplásmico y/o endoplásmico |
| SERCA1 | Isoforma 1 de SERCA |
| SL | Sarcolema |
| TT | Sistema de túbulos transversos |

Indice de Figuras

| | | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Sacudida simple, Sumación, Contractura, Tetanus, Fatiga | 17 |
| Figura 2 | Sarcómero | 19 |
| Figura 3a | Molécula de miosina | 20 |
| Figura 3b | Molécula de actina | 20 |
| Figura 4 | Microfotografía de TT | 21 |
| Figura 5 | Miofibrillas con RS | 21 |
| Figura 6 | Triada | 22 |
| Figura 7 | Acople Excitación-Constracción por contacto directo | 23 |
| Figura 8 | Gel de TT | 23 |
| Figura 9 | Receptor de dihidropiridina | 25 |
| Figura 10 | PMCA | 28 |
| Figura 11 | Gel de RS | 29 |
| Figura 12 | Receptor de rianodina | 32 |
| Figura 13 | Esquema de la estructura de SERCA | 34 |
| Figura 14a | Ciclo catalítico de SERCA | 35 |
| Figura 14b | Rotación de las α -hélices durante el ciclo catalítico | 35 |
| Figura 15 | Conejos adaptados al ejercicio en banda sin fin | 54 |
| Figura 16 | Materiales y métodos | 62 |
| Figura 17 | Western Blots de TT y RS anti-RDHP y anti-SERCA1 | 63 |
| Figura 18A | Actividad normalizada de la captura de Ca^{2+} de TT (adaptación) | 64 |
| Figura 18B | Actividad normalizada de la captura de Ca^{2+} de RS (adaptación) | 64 |

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 19A | Actividad normalizada de ATPasa de Ca^{2+} de TT (adaptación) | 65 |
| Figura 19B | Actividad normalizada de ATPasa de Mg^{2+} de TT (adaptación) | 65 |
| Figura 19C | Actividad normalizada de ATPasa de Ca^{2+} de RS (adaptación) | 65 |
| Figura 20A | Calorimetría diferencial de barrido de TT (control) | 66 |
| Figura 20B | Calorimetría diferencial de barrido de TT (adaptación) | 66 |
| Figura 21A | Calorimetría diferencial de barrido de RS (control) | 68 |
| Figura 21B | Calorimetría diferencial de barrido de RS (adaptación) | 68 |
| Figura 22 | Registro de Fatiga Muscular | 69 |
| Figura 23A | Actividad normalizada de la captura de Ca^{2+} de TT (fatiga) | 70 |
| Figura 23B | Actividad normalizada de la captura de Ca^{2+} de RS (fatiga) | 70 |
| Figura 24A | Actividad normalizada de ATPasa de Ca^{2+} de TT (fatiga) | 71 |
| Figura 24B | Actividad normalizada de ATPasa de Ca^{2+} de RS (fatiga) | 71 |
| Figura 25A | Calorimetría diferencial de barrido de TT (control) | 71 |
| Figura 25B | Calorimetría diferencial de barrido de TT (fatiga) | 71 |
| Figura 26A | Calorimetría diferencial de barrido de TT (fatiga; en presencia de altas concentraciones de CaCl_2) | 72 |
| Figura 26B | Calorimetría diferencial de barrido de TT (adaptado) | 72 |
| Figura 27A | Calorimetría diferencial de barrido de RS (control) | 73 |
| Figura 27B | Calorimetría diferencial de barrido de RS (fatiga) | 73 |
| Figura 28 | Modelo de AEC en adaptación y fatiga | 85 |

RESUMEN

Durante la actividad muscular prolongada, la liberación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico (RS) incrementa la concentración citoplasmática de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Los mecanismos que tiene la célula para mantener la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incluyen a la actividad de las ATPasas de Ca^{2+} de las membranas de RS principalmente y de los túbulos transversos (TT). En este trabajo se describen y analizan los cambios observados en las actividades y en las estructuras de las ATPasas de Ca^{2+} de RS y TT y de la ATPasa de Mg^{2+} de los TT, además de los cambios conformacionales observados en los receptores de dihidropiridina (RDHP) de los TT, involucradas en los eventos del acople excitación-contracción (AEC). Estos cambios se produjeron como consecuencia de a) un régimen de ejercicio rutinario que se llevó a cabo durante un periodo de ocho semanas y b) la actividad muscular prolongada inducida por estimulación eléctrica del nervio femoral, que produjo un estado de fatiga en los músculos tibial anterior y gastrocnemio. Los resultados observados bajo las condiciones experimentales mencionadas, muestran 1) un aumento en la actividad de transporte y de hidrólisis de las ATPasas de TT, acompañado de cambios conformacionales importantes, que se observaron en membranas obtenidas de conejos entrenados en reposo, 2) una disminución en la captura de Ca^{2+} , pero no en la hidrólisis de ATP de las bombas de Ca^{2+} de membranas de RS como de TT, obtenidas de músculo esquelético fatigado de conejo, acompañada de cambios conformacionales, y 3) cambios conformacionales en los RDHP de músculo adaptado y fatigado.

La conclusión de este trabajo es que tanto adaptación al ejercicio como fatiga muscular producen cambios conformacionales estables en las bombas de Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPasas y receptores de dihidropiridina de TT y el dominio de fijación de Ca^{2+} de SERCA, que pueden estar acompañados de cambios funcionales.

ABSTRACT

During long-term muscular activity Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum (SR) increases the cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The cellular mechanisms to maintain homeostasis of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ include the activity of the Ca^{2+} -ATPases of the SR in the first place and of the transverse tubuli (TT) membranes. In this work, we describe and analyze the changes observed in the activities and in the structures of the SR and TT Ca^{2+} -ATPases and of the TT Mg^{2+} -ATPase, and also the conformational changes observed in the TT dihydropyridine receptors (DHPR), involved in events of excitation-contraction coupling (ECC). All these changes occurred as a consequence of a) routine exercising that took place along a period of eight weeks, and b) prolonged muscular activity induced by electric stimulation of the femoral nerve producing fatigue in tibialis anterior and gastrocnemius muscle. Results observed under the experimental conditions mentioned above, show 1) an increase in the activity of the TT ATPases along with important conformational changes observed in membranes obtained from trained rabbits at rest, 2) a reduction in Ca^{2+} -uptake, but not in ATP hydrolysis by SR and TT ATPases, also linked to conformational changes in the proteins of membranes obtained from fatigued rabbit skeletal muscle, and 3) conformational changes in the DHPR of trained and fatigued muscle.

We conclude in this work that adaptation to exercise as well as muscle fatigue produce stable conformational changes in TT Ca^{2+} -bombs, Mg^{2+} -ATPases and dihydropyridine receptors, and in the Ca^{2+} binding domain of SERCA, changes, that can be accompanied by functional changes.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--------------------------------------------------------------|---------------|
| ABREVIATURAS | 6 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 7 |
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRACT | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| 1 El Tejido Muscular | 15 |
| 1.1 Músculo Estriado Esquelético | 15 |
| 1.2 Características mecánicas del músculo esquelético | 17 |
| 1.3 Hipertrofia Muscular | 18 |
| 1.4 Características bioquímicas del tejido muscular | 19 |
| 1.4.1 La triada | 22 |
| 1.4.2 Túbulos transversos | 23 |
| Aspectos generales | 23 |
| Receptores de dihidropiridina (RDHP) | 24 |
| ATPasa de Ca^{2+} (PMCA) | 26 |
| ATPasa de Mg^{2+} | 28 |
| Composición lipídica | 30 |
| 1.4.3 Retículo sarcoplásmico | 30 |
| Aspectos generales | 30 |
| Receptores de rianodina (RyR) | 31 |
| ATPasa de Ca^{2+} (SERCA) | 33 |

| | | |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2 | Teorías sobre el Mecanismo del Acoplamiento Excitación-Contracción (AEC) | 36 |
| 2.1. | AEC por interacción directa entre RyR y RDHP | 37 |
| 2.2 | AEC modulado por Proteínas intercaladas entre RyR y RDHP | 38 |
| 2.3 | AEC modulado por IP ₃ como segundo mensajero | 39 |
| 2.4 | AEC modulado por Ca ²⁺ como segundo mensajero | 40 |
| 3. | Adaptación al ejercicio | 41 |
| 3.1 | Estimulación Crónica de Baja Frecuencia (ECBF) | 42 |
| 3.2 | Entrenamiento | 43 |
| 4. | Fatiga Muscular | 45 |
| 4.1 | Una falla en la transmisión de la señal de TT a RS | 46 |
| 4.2 | Inadecuada apertura por acción directa sobre RyR | 48 |
| 4.2.a. | Una elevada concentración intracelular de Ca ²⁺ [Ca ²⁺] _i | 48 |
| 4.2.b. | Especies reactivas de oxígeno y derivados del óxido nítrico | 49 |
| 4.2.c. | Alteraciones en otros metabolitos de la actividad muscular | 51 |
| | HIPÓTESIS | 52 |
| | OBJETIVOS | 53 |
| | MATERIALES Y MÉTODOS | 54 |
| 1. | Protocolo de adaptación al ejercicio | 54 |
| 2. | Protocolo para obtener músculos tibiales anteriores, extensores digitales largos y gastrocnemios blancos | 55 |
| 3. | Aislamiento de vesículas de membranas de retículo sarcoplásmico ligero y túbulos transversos | 56 |

| | | |
|-----|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4. | Determinación de la concentración de proteína con azul de Coomassie | 57 |
| 5. | Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y tinciones | 57 |
| 6. | Anticuerpos | 58 |
| 7. | Inmunoelectrotransferencias | 58 |
| 8. | Captura de Ca^{2+} dependiente de ATP | 59 |
| 9. | Actividad hidrolítica de ATP (ATPasa) | 59 |
| 10. | Determinación de la unión de alta afinidad de la DHP | 60 |
| 11. | Normalización de valores | 60 |
| 12. | Calorimetría Diferencial de Barrido | 61 |
| | RESULTADOS | 63 |
| 1. | Pureza de membranas | 63 |
| 1.1 | Inmunoelectrotransferencias | 63 |
| 1.2 | Unión específica de DHP y rianodina | 64 |
| 2. | Adaptación del Músculo Esquelético al Ejercicio | 64 |
| 2.1 | Actividad de captura de Ca^{2+} | 64 |
| 2.2 | Actividad hidrolítica de ATPasa | 65 |
| 2.3 | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) | 66 |
| 3. | Fatiga muscular | 68 |
| 3.1 | Registros de fatiga muscular | 68 |
| 3.2 | Actividad de captura de Ca^{2+} | 70 |
| 3.3 | Actividad hidrolítica de ATPasa | 70 |
| 3.4 | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) de TT | 71 |
| 3.5 | Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) de RS | 72 |

| | |
|--------------------------------------------------------------|-----------|
| DISCUSIÓN | 73 |
| 1. Adaptación del Músculo Esquelético al Ejercicio | 73 |
| 2. Fatiga del Músculo Esquelético por Estimulación Eléctrica | 79 |
| CONCLUSIÓN | 84 |
| PERSPECTIVAS | 87 |
| BIBLIOGRAFÍA | 88 |

ARTÍCULOS

1. Becker V, González-Serratos H, Álvarez R, Bäermann M, Irlles C y Ortega A (2004)
Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 97: 467-474.
2. Ortega A, Becker VM, Álvarez R, Lepock JR y González-Serratos H (2000)
Interaction of D-600 with the transmembrane domain of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Am J Cell Physiol* 279: C166-C172.

INTRODUCCIÓN

1. El Tejido Muscular

Debido a la presencia o ausencia de un patrón de estriaciones, que se produce por el arreglo de las proteínas contráctiles, el tejido muscular se divide en dos tipos principales, que son el músculo **liso** y el músculo **estriado**. Así mismo, el músculo estriado se subdivide en músculo cardíaco y esquelético. El músculo **liso**, involuntario, consta de células fusiformes con núcleo central. Se encuentra en tracto gastrointestinal, vejiga, uretra, arterias, arteriolas, bronquios y bronquiólos, y está regulado por el sistema nervioso autónomo y hormonas. La contracción del músculo liso es lenta, espontánea, prácticamente no fatigable y se lleva a cabo después de la fosforilación de la cadena ligera de miosina (ver *miosina* en sección 1.3) por un complejo Ca^{2+} /calmodulina/proteína cinasa. Los cambios en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} están reguladas por el flujo y transporte a través de la membrana plasmática. La célula de músculo estriado **cardíaco** es alargada y multinucleada. La entrada de pequeñas cantidades de Ca^{2+} al interior de las células a través de la membrana plasmática induce la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} de almacenes intracelulares (CICR = *calcium induced calcium release*), lo cual permite la contracción. La frecuencia de la contracción cardíaca está regulada por el sistema nervioso autónomo. La fibra de músculo estriado **esquelético** está inervada por una alfa-motoneurona que está bajo el dominio de la voluntad, y el Ca^{2+} que induce la contracción proviene de fuentes intracelulares.

1.1 Músculo Estriado Esquelético

Por sus propiedades contráctiles y las isoformas de sus proteínas, se distinguen dos diferentes tipos de fibras en músculo esquelético. Se trata de fibras de contracción **lenta**

(slow twitch), *ST* o tipo *I*, y de contracción **rápida** (fast twitch), *FT* o tipo *II*. Estos tipos de fibras musculares se distinguen por su velocidad de contracción, predisposición a sufrir fatiga, las propiedades bioquímicas y fisiológicas de su ATPasa de miosina, sus vías metabólicas de obtención de energía (oxidativa o anaeróbica), la cantidad de mitocondrias, su color, diámetro y capilaridad. Los diferentes tipos de fibras son usados para diferentes tipos de ejercicio. Las diferencias entre músculo esquelético rápido y lento se describen en la siguiente tabla.

Diferencias entre fibras musculares rápidas y lentas

| | Rápido | Intermedio | Lento |
|--------------------------|-------------|------------------------|-----------|
| Clasificación | <u>FG</u> | <u>FOG</u> | <u>SO</u> |
| Metabolismo | glicolítico | oxidativo/ glicolítico | oxidativo |
| | I lb | I a | I |
| Color | blanco | intermedio | rojo |
| Mioglobina | + | ++ | +++ |
| Glucógeno | +++ | ++ | + |
| Lípidos | + | ++ | +++ |
| Diámetro | + | ++ | +++ |
| Capilaridad | + | ++ | +++ |
| Velocidad | +++ | ++ | + |
| Mitocóndrias | + | ++ | +++ |
| Fosforilasa de glucógeno | +++ | ++ | + |
| SDH | + | ++ | +++ |
| ATPasa de miosina | + | + | +++ |

1.2 Características Mecánicas de Músculo Esquelético

- Sacudidas, Contracturas y tétanos -

La contracción y relajación de un músculo en respuesta a un estímulo simple se llama *sacudida simple (twitch)* (Figura 1). Si un segundo estímulo es aplicado antes de que se haya completado la relajación, la segunda contractura se une a la primera, y la fuerza de la segunda es mayor. A este fenómeno se llama *sumación* (Figura 1) y se debe a que no ha sido secuestrado todo el Ca^{2+} liberado por el RS. Entonces, la mayor concentración de Ca^{2+}

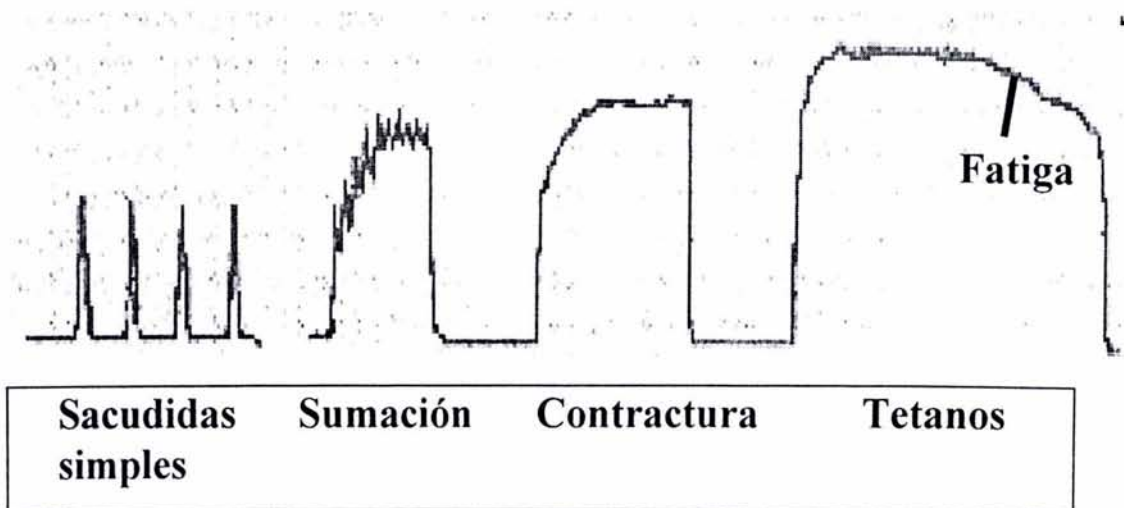


Figura 1. Registros de contracción y relajación en sacudidas simples, sumación, contractura, tetanos y fatiga provocados por estimulación eléctrica.

en el citoplasma activa más la contracción. Si el estímulo es repetido a una frecuencia suficientemente alta, el músculo no se relaja entre cada estímulo y se mantiene en un estado de contractura muscular (Figura 1). Si el estímulo que provoca la contractura se mantiene, la fibra pierde tensión independientemente de la amplitud y duración del estímulo,

fenómeno conocido como fatiga muscular (Figura 1). La fuerza de contracción de un tétanos es mayor a la de una sacudida simple.

Si el estímulo es suficientemente fuerte para activar a todas las fibras del músculo, se logra la *máxima fuerza de contracción tetánica*.

1.3 Hipertrofia Muscular

La **actividad muscular pesada**, aunque se lleve a cabo durante intervalos cortos, hace que el músculo se agrande debido a un aumento en los diámetros de las fibras musculares individuales, fenómeno al que se le denomina *hipertrofia muscular*. Es causado por un aumento en las proteínas contráctiles y membranas, pero no por un solo aumento de líquido. El resultado es un incremento en el poder de carga del músculo. La **actividad muscular moderada**, incluso si se lleva a cabo durante un tiempo prolongado, no origina hipertrofia muscular, pero sí eleva la resistencia, incrementando las enzimas oxidativas, la mioglobina e incluso los capilares sanguíneos para un mayor metabolismo oxidativo. Por otro lado, el tejido muscular no es capaz de regenerarse aumentando el número total de fibras musculares por división celular, fenómeno al que se le llama *hiperplasia*. Cuando hay lesiones de células, éstas son reemplazadas con tejido cicatricial.

1.4 Características bioquímicas del tejido muscular

El tejido muscular esquelético consiste en un 71% de agua, 22% de proteína y 7% de lípidos. La fibra muscular es alargada, multinucleada y no se ramifica. A su membrana plasmática se le denomina *sarcolema* (SL) y al citoplasma, *sarcoplasma* o *mioplasma*. A lo largo de la fibra corren las miofibrillas que presentan el aspecto estriado característico del músculo esquelético. Basándose en estas estrías se han identificado los sarcómeros, que son las unidades estructurales y funcionales en la contracción del músculo esquelético estriado

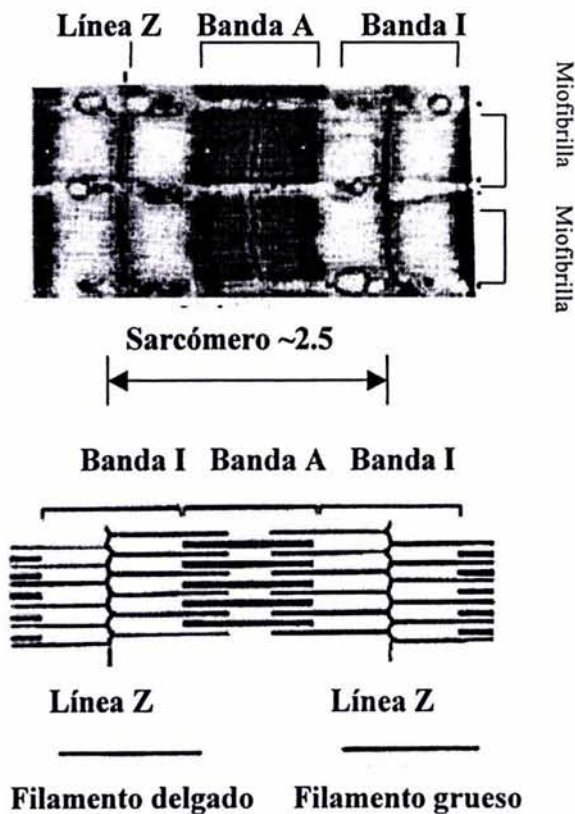
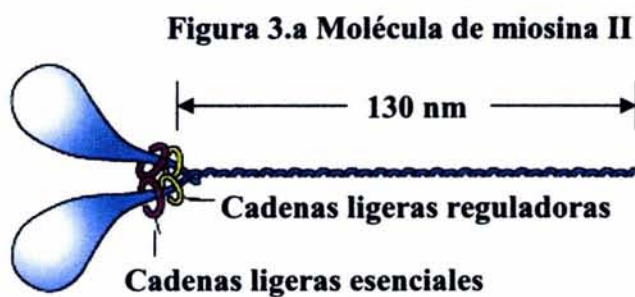


Figura 2. Esquema del sarcómero, que está delimitado por dos líneas Z, de las cuales están suspendidos los filamentos delgados. Las bandas I (isocrómicas: no desvían la luz polarizada) están conformadas solo por filamentos delgados. Las bandas A (anisocrómicas: desvían la luz polarizada) contienen filamentos delgados y gruesos.

y miden de 2.0 a 2.6 micras. Las estrías del sarcómero se observan gracias al arreglo característico de los dos tipos diferentes de miofilamentos por los cuales están compuestas las miofibrillas (Figura 2). Hay miofilamentos gruesos y delgados. Los filamentos gruesos miden 1.6 micras de largo y 10 a 14nm de diámetro, y están formados por la proteína

miosina. Los filamentos delgados miden 1.0 micras de largo y 7nm de diámetro, y están formados por actina, tropomiosina y el complejo de troponina. El sarcómero presenta bandas *A* más oscuras o anisotrópicas, donde se sobreponen los filamentos gruesos y delgados. Las bandas *I* (isotrópicas) son más claras y corresponden a los sitios donde sólo está presente un tipo de filamento, que es el delgado. Las líneas Z corresponden a las regiones dónde la Sarcolema forma invaginaciones, que se distribuyen en una amplia red de membranas llamada sistema de túbulos transversos (TT), a través de la fibra muscular. En la línea Z se encuentra la α -actinina, que ancla a los filamentos delgados a la línea Z.

La molécula de miosina posee una porción helicoidal fibrilar compuesta por dos

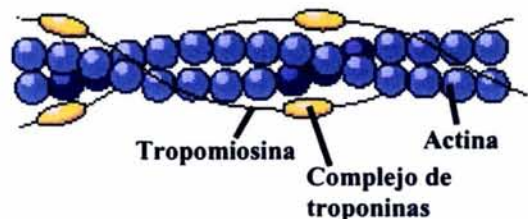


cadenas pesadas (peso molecular 200,000), y una cabeza globular con 4 cadenas ligeras (peso molecular 16,000 a 27,000) (Figura 3a).

La actina F es un polímero formado de 300 monómeros de actina G y forma una doble hélice a lo largo de la cual están las moléculas de tropomiosina. En sitios específicos de la tropomiosina se encuentran los complejos de troponina, compuestos por las troponinas T, C e I (Figura 3b).

Todas estas proteínas ayudan en la formación de los puentes cruzados entre los dos

Figura 3.b Filamento delgado



tipos de filamentos, que resulta en el acortamiento de los sarcómeros y la contracción muscular. La relajación muscular se lleva a cabo gracias a la actividad de Mg^{2+} -ATPasa de la miosina, que interrumpe los puentes cruzados.

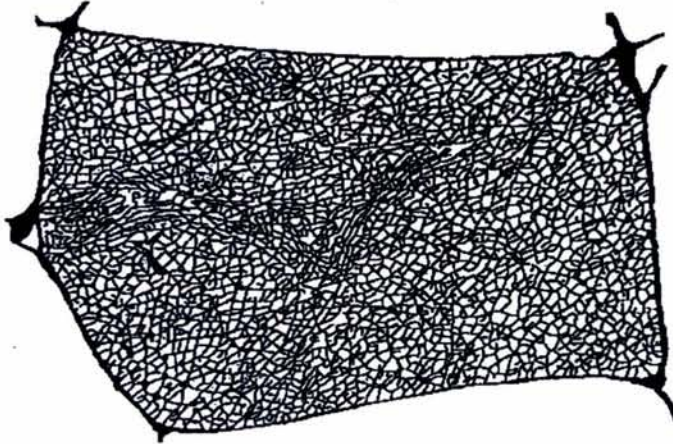


Figura 4. Microfotografía del sistema de TT de una fibra muscular de rana teñida con peroxidasa (Peachey LD y Eisenberg BR, 1978). Se aprecia la red de ramificaciones tubulares que se origina de las invaginaciones de la sarcolema.

La red de membranas que se origina de las invaginaciones de la Sarcolema al nivel de las líneas Z denominada sistema de túbulos transversos (TT) tiene un diámetro de apertura de aproximadamente 30 nanómetros (Figura 4).

Alrededor de las miofibrillas se encuentra el retículo sarcoplásmico (RS), que se caracteriza por tener regiones tubulares o longitudinales y terminaciones en cisternas (CT). La función del RS es el almacenamiento intracelular de Ca^{2+} (Figura 5).

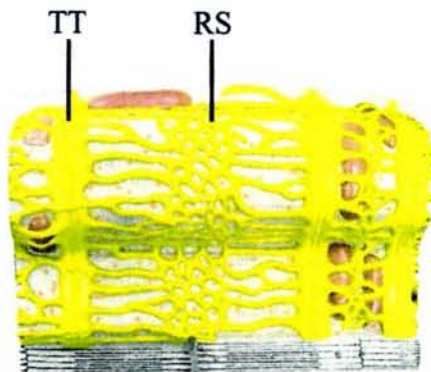


Figura 5. Esquema que muestra el Retículo sarcoplásmico con sus regiones longitudinales y cisternas terminales y los Túbulos Transversos del músculo estriado de rana (Peachey LD, 1965)

1.4.1. La Triada

A cada lado de una porción de los TT se encuentran las cisternas terminales (CT). Al arreglo membranal que comprende una porción de TT y dos de CT se le conoce como *la triada* (Figura 6), que es la unidad funcional en el acople excitación-contracción. El espacio

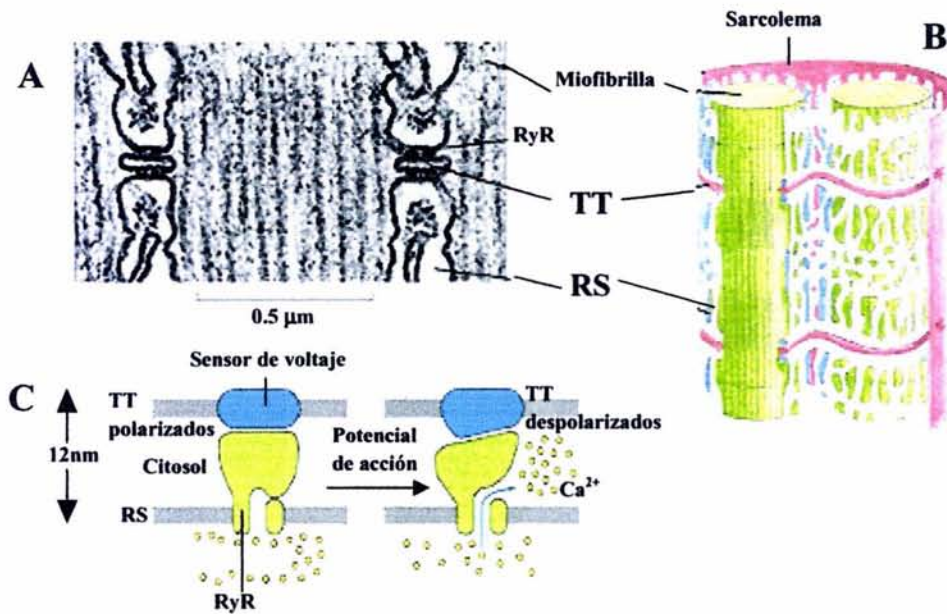


Figura 6. La triada. Se observan: (A) microfotografía y (B) esquema del arreglo de una porción de TT rodeada por dos cisternas terminales (CT) en triadas, (C) el espacio entre las membranas de TT y una CT con los RDHP y RyR involucrados en el acople excitación-contracción. entre TT y RS mide alrededor de 12 nm y en este espacio se han observado por microscopía electrónica estructuras más densas denominadas *pies (feet)* que corresponden a los *receptores de rianodina (RyR)* y que son proteínas integrales de las membranas de RS en su porción de las CT (64, 69, 77, 87, 126, 137). Los RyR tienen la función de canales de Ca^{2+} , y participan en el acople excitación-contracción (AEC) a través de la interacción con su contraparte en los TT de la triada que son los *receptores de dihidropiridina (RDHP)*. Aunque no existe una continuidad eléctrica entre los TT y el RS se tienen evidencias que la comunicación entre estas dos proteínas se lleva a cabo por contacto directo (81, 82) (Figura

7), aunque la interacción entre el RDHP y el RyR podría ser estabilizada por la acción de otras proteínas, como la triadina (136).

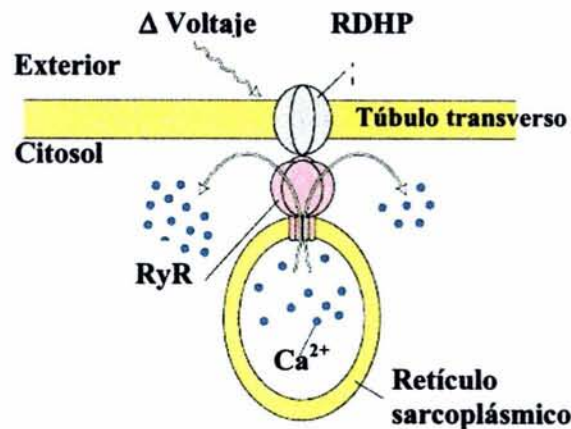


Figura 7. Acople Excitación-Contracción por contacto directo entre el receptor de dihidropiridina y el receptor de rianodina

1.4.2 Túbulos transversos

Aspectos Generales

Las funciones principales de los TT son la propagación del potencial de acción al interior de la fibra muscular y la comunicación con el RS. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se han identificado los pesos moleculares de las proteínas integrales de estas membranas y las proteínas solubles que se copurifican con ellas (Figura 8). En el rango de 90,000 a 115,000 kDa se encuentran el 80% de las proteínas de la membrana de los TT, como son la ATPasa de Mg^{2+} , la subunidad α de la ATPasa de Na^+/K^+ y en menor proporción una ATPasa de Ca^{2+} . Esta última ha sido identificada mediante Western Blot e inmunocitoquímica como PMCA1 (124). En el rango de 140 a 170 kDa se encuentran las bandas relacionadas con los RDHP (26). Mediante Western Blot se determinó la colocalización de un intercambiador Na^+/Ca^{2+} (bandas de 70, 120 y 160 kDa, de las cuales

la de 120 kDa corresponde a la proteína intacta), el RDHP y la ATPasa de Ca^{2+} PMCA1 en el dominio de membrana de los TT que corresponde a la triada (124). La seroalbúmina de 68 kDa es un contaminante común en las preparaciones de TT de conejo (122). Una

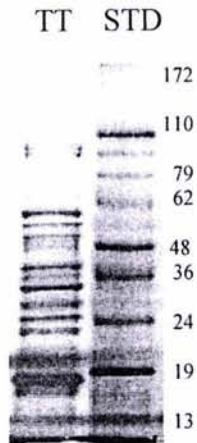


Figura 8. Gel SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida al 10 % con 5 μg de proteína por carril (TT= membranas de túbulos transversos, STD= estándar), teñido con plata.

proteína que tiene alrededor de 70 a 72 kDa, y que interactúa con el RyR (24, 26) se ha aislado con membranas de TT, pero se desconoce su función. La gliceraldehído 3P-DH de 38 kDa y una proteína de 30 kDa han sido encontradas exclusivamente en los geles de TT (26).

Receptores de dihidropiridina (RDHP). En las membranas de TT de fibras musculares esqueléticas se encuentran receptores a las 1,4-dihidropiridinas (DHP) (72). Estos receptores son canales de Ca^{2+} del tipo L (corrientes lentas). Las corrientes de Ca^{2+} hacia el interior de la célula pueden ser bloqueadas por diversas sustancias denominadas genéricamente como bloqueadores de los canales de Ca^{2+} como: a) las DHPas como la nitrendipina y la nifedipina, b) las fenilalquilaminas como el verapamil y el D600 y c) los derivados de las benzodiazepinas como el diltiazem. Estas corrientes lentas de Ca^{2+} son dependientes del voltaje. Los sensores de voltaje de la proteína detectan la despolarización de las membranas de superficie e inducen la apertura de los canales de Ca^{2+} de RS por contacto directo.

Existen dos isoformas del RDHP, denominadas esquelética y cardiaca. La isoforma esquelética se expresa más en músculo rápido y la isoforma cardiaca se expresa en forma significativa en diafragma, músculo esquelético lento y músculo esquelético rápido

expuesto a estimulación crónica de baja frecuencia (110, 111). La existencia de dos diferentes isoformas podría estar implicada en las diferencias en los mecanismos del AEC en los diferentes tipos de músculo.

El RDHP está compuesto por cuatro o cinco subunidades: a) $\alpha 1$ de peso molecular 175,000, b) $\alpha 2$ de peso molecular 170,000, c) β de peso molecular 52,000, d) γ de peso molecular 32,000 (84) y e) una pequeña subunidad llamada δ . La región del RDHP con

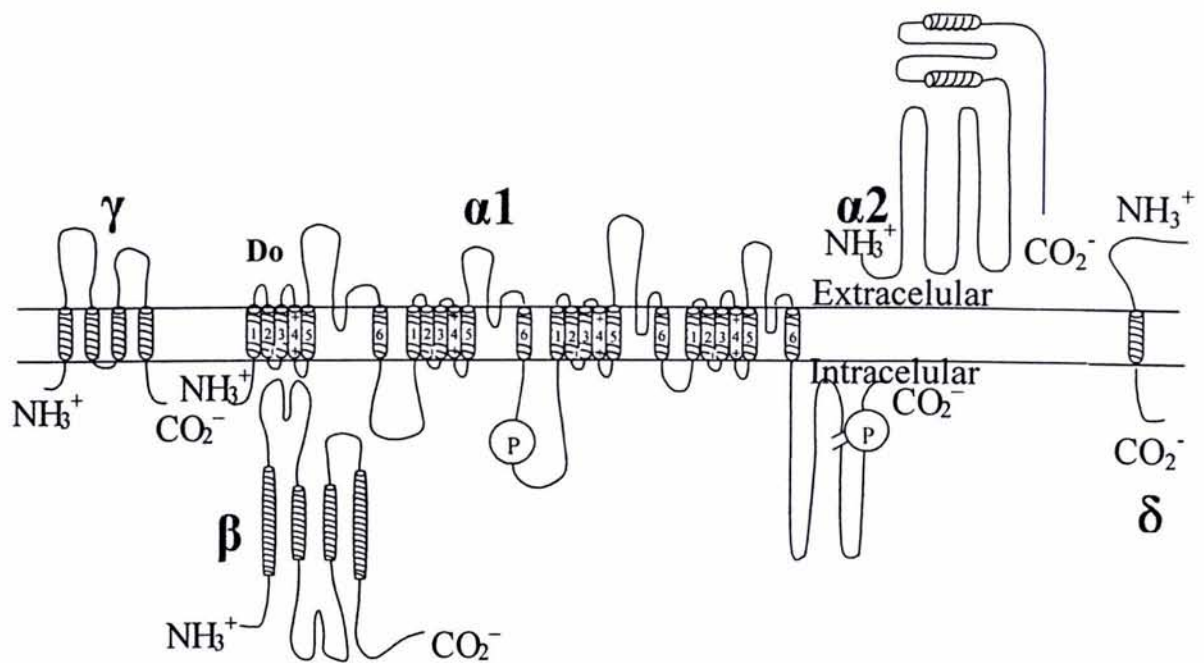


Figura 9. Subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, β , γ y δ de los canales de Ca^{2+} tipo L (RDHP) de músculo esquelético. Este modelo también se aplica para otros canales Ca_v1 y Ca_v2 . P= Sitios de fosforilación por proteína cinasa dependiente de cAMP; tiene sitios de glicosilación ; las alfa hélices son representadas por cilindros (adaptación según Catterall WA, 2000, ref. 25)

función de canal está formada por la subunidad $\alpha 1$, que consta de cuatro dominios transmembranales (I, II, III, IV) con seis alfa-hélices cada una (S1 a S6) y tres asas

citoplasmáticas, de las cuales las asas II-III y III-IV interactúan con el RyR y las alfa-hélices S4 constituyen los sensores de voltaje (Figura 9).

Aproximadamente la mitad de los receptores se encuentran ubicados próximos a la región de unión entre TT y RS y su distribución es de 3 a 4 veces mayor en fibras tipo II (rápidas) que en las de tipo I (lentas). Es importante aclarar que menos del 5% de los RDHP ubicados en los TT son canales funcionales de Ca^{2+} (72) y la inhibición de las corrientes lentas de Ca^{2+} con bloqueadores de los canales de Ca^{2+} no evita que se originen contracturas simples "twiches" en el músculo esquelético rápido (46). Se ha sugerido que los RDHP en su función de sensores del voltaje producen movimientos de cargas intramembranales durante la despolarización de la membrana con la consecuente liberación de Ca^{2+} del RS a través de los canales de Ca^{2+} (RyR) adyacentes (119).

ATPasa de Ca^{2+} (PMCA). Los TT poseen una actividad baja de ATPasa de Ca^{2+} , la cual se ha relacionado con un transporte de Ca^{2+} dependiente de Mg^{2+} (97, 122). Por otro lado, Carafoli et al identificaron en TT la presencia de una ATPasa de Ca^{2+} que pertenece a la familia de las ATPasas de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA), y la isoforma identificada fue PMCA 1 (124). Las PMCA pertenecen a la familia de las ATPasas tipo P. Se encuentran en todas las células de mamífero, aunque sólo constituyen el 0.1% de la proteína total. Tienen un peso molecular entre 100,000 y 130,000 (52), una o dos subunidades y son codificadas por cuatro genes diferentes, que generan más de 30 isoformas por edición alternativa, principalmente en los sitios *A* (cerca de la terminal amino) y *C* (cerca de la terminal carboxilo) (23, 52). Las bombas de Ca^{2+} PMCA1 y PMCA4 son ubicuas, mientras que PMCA2 y 3 se encuentran principalmente en cerebro y corazón. La estructura de la PMCA está caracterizada por la presentación de cuatro unidades citoplasmáticas que comprenden la terminación N, un sitio de interacción con

fosfolípidos, el sitio catalítico con el dominio de unión de ATP y un número de sitios reguladores, como el sitio de unión de calmodulina, el cual también interactúa con fosfolípidos (52). La región transmembranal está compuesta por 10 alfa-hélices. Se ha descrito que la estequiometría de las PMCA es de una molécula de Ca^{2+} transportada por una molécula de ATP hidrolizado, y su ciclo catalítico está acoplado a dos estados conformacionales llamados E1 y E2 (52). El transporte de Ca^{2+} a la luz de los TT, a diferencia del transporte de Ca^{2+} en el RS, es lento, estimulado por calmodulina e insensible al oxalato (60, 97). La **calmodulina** fija 4 moléculas de Ca^{2+} lo cual hace su superficie más hidrofóbica para unirse a un dominio autoinhibidor básico de la terminación carboxilo de la PMCA, lo cual elimina la autoinhibición y aumenta su afinidad por Ca^{2+} y su V_{max} . La calmodulina solo puede activar a la PMCA cuando está unida a Ca^{2+} . Así, el Ca^{2+} regula su propia concentración citoplasmática. A niveles bajos de Ca^{2+} , la PMCA está relativamente inactiva, debido a una calmodulina inactiva. Al elevarse la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, Ca^{2+} se une a la calmodulina, que a su vez se une a la PMCA que así es activada para transportar más Ca^{2+} al medio extracelular. Las diferentes isoformas de PMCA se distinguen por su afinidad a la calmodulina. La PMCA2 tiene la más alta afinidad por calmodulina, lo que significa a su vez una mayor afinidad por Ca^{2+} a concentraciones bajas. Por otro lado, PMCA1 y 4 tienen una baja afinidad por calmodulina y Ca^{2+} , lo que significa que en músculo esquelético, el transporte de Ca^{2+} al exterior de la célula sería más probable a altas concentraciones intracelulares de calmodulina y Ca^{2+} . También hay indicios que la unión de calmodulina a la PMCA1 depende en algunas isoformas del pH, lo que podría ser importante en músculo esquelético durante la actividad elevada que se acompaña por cambios en el pH de la célula. La actividad de las PMCA también es activada por **fosfolípidos ácidos** (128). La

actividad de las PMCA se inhibe por concentraciones micromolares de ortovanadato y por La^{3+} (52). La capacidad de los TT de transportar Ca^{2+} al exterior de la célula puede tener como resultado el mantenimiento de la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en conjunto con el transporte de Ca^{2+} por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de TT, la PMCA de SL, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de SL y la SERCA de RS. Finalmente, se cree que la

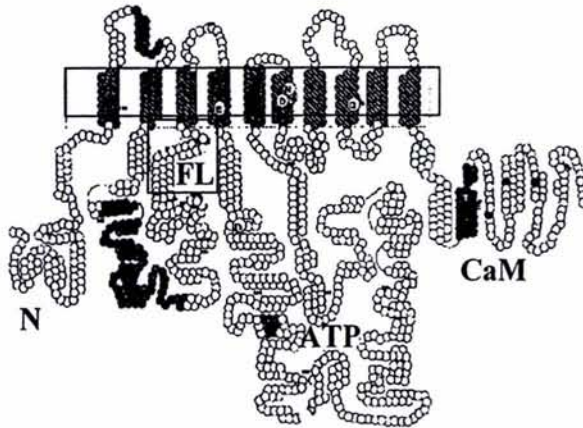


Figura 10. Modelo de la bomba PMCA. N = terminal amino, FL = sitio de unión de fosfolípidos, ATP = sitio de unión de ATP, CaM = sitio de unión de calmodulina (CaM), que es el otro sitio de unión para fosfolípidos. Alfa-hélices son representados por cilindros (52).

fosforilación de las PMCA en diferentes sitios por proteínas cinasas sirva para la regulación de su actividad. En plaquetas, la fosforilación de la bomba PMCA 4 en Tyr 1176 resultó en una disminución de su actividad (31) célula.

ATPasa de Mg^{2+} . Esta enzima es una glicoproteína de peso molecular 105,000, que corresponde al 80% de la proteína total de membrana en los TT, pero que, después de ser purificada mediante cromatografía apareció como una proteína de peso molecular 67,000, de muy alta actividad específica y presente en cantidades pequeñas en membranas de TT (141). Si además se somete a desglicolización, aparece como banda de 52,000 en los geles SDS-PAGE (141). La ATPasa de Mg^{2+} está ubicada principalmente en las regiones de la triada. Su actividad hidrolítica, a la que se le denomina también como actividad basal de ATPasa, es específica de los TT (58), ya que preparaciones puras de RS no la presentan, y tiene las siguientes características: 1) no se estimula por Ca^{2+} ya que su actividad se

observa en ausencia de Ca^{2+} y a concentraciones milimolares de Mg^{2+} o a concentraciones milimolares de Ca^{2+} y en ausencia de Mg^{2+} , por lo que se le denomina $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPasa, a diferencia de la Mg^{2+} -ATPasa estimulada por concentraciones nanomolares de Ca^{2+} (Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa). 2) La ATPasa de Mg^{2+} tiene una K_m aparente de 170 μM en presencia de Mg^{2+} y 180 μM en presencia de Ca^{2+} , y una V_{max} de 2.9 $\mu\text{molas Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (58,143), 3) el rango del pH para su actividad máxima es amplio, entre 1 y 1.75 $\mu\text{molas mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ entre pH 5 y 8.5 (58, 91) a diferencia de la SERCA que tiene un rango de pH estrecho, entre pH 6 y 8.5 para el mismo rango de actividad (58, 90), 4) su punto isoeléctrico es de pH 5, y la carga neta de la proteína se debe principalmente a la presencia de ácido siacílico en las cadenas de glicano (141), 5) se distingue de otras ATPasas por su insensibilidad a varios inhibidores como ouabaina, oligomicina, rojo de rutenio, verapamil, D600, azida, ortovanadato, arsénico, cianuro, aurovertina, AMP, ADP, P_i , y FITC (92, 143), así como a la calmodulina, por lo que se desconoce si su función es el transporte iónico, 6) es sensible a la inhibición por detergentes como el TritónX100 a concentraciones que no afectan a la SERCA o a la Na^+/K^+ -ATPasa (58, 90, 91, 105, 143), 7) se activa por concanavalina A (122), y finalmente 8) se distingue de las ATPasas de Ca^{2+} , tanto de la SERCA como de la de TT por sus temperaturas de inactivación y desnaturalización (83, 106). Existen reportes que sugieren que se trata de una ecto-ATPasa (123), cuya función podría ser la regulación de la concentración extracelular de ATP y su disponibilidad para purinoceptores o ectoproteína cinasas extracelulares, así como para modular la posible función del ATP y adenosina como neurotransmisor (31). Sin embargo, en músculo esquelético la orientación de la Mg^{2+} -ATPasa no ha sido determinado con certeza.

Composición lipídica de los TT. La fosfatidilcolina constituye el 50% de los fosfolípidos totales de los TT, que corresponde a un 15 a 20% menos que en RS. Sin embargo, en comparación con el RS, su contenido de esfingomielina es de 5 a 8 veces mayor y contienen un porcentaje mayor de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (121). La relación fosfolípidos/proteínas es de 2.5, y la relación colesterol/fosfolípido es de 0.4 a 0.9, esto es ocho veces más colesterol que en el RS y 2.2 veces más que en la SL. Se sabe que altas concentraciones de colesterol están asociadas a una elevada concentración de esfingomielina en una membrana (30). La relación actividad de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa /colesterol se ha utilizado para distinguir entre membranas de TT y SL (60).

De la composición lipídica de las membranas se pueden deducir sus propiedades biofísicas. El alto contenido de colesterol en los TT se ha relacionado con la baja fluidez de estas membranas (55). De igual manera, su composición lipídica característica podría ayudar a explicar las diferencias cinéticas entre las actividades de las ATPasas de Ca^{2+} de RS y TT como resultado de la interacción entre lípidos y proteínas.

1.4.3 Retículo Sarcoplásmico

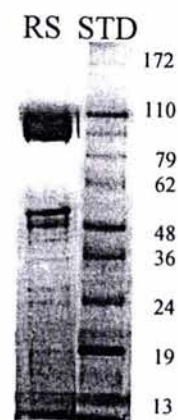
Aspectos Generales

El RS constituye el más importante almacén de Ca^{2+} intracelular. Tiene una porción tubular longitudinal y otra formada por las cisternas terminales (CT). En la luz de las cisternas terminales se encuentra la proteína **calsecuestrina** que tiene cuatro sitios de unión para Ca^{2+} con una moderada afinidad por el Ca^{2+} . Cuando la calsecuestrina está en estado fosforilado no tiene efectos sobre la apertura de los canales de Ca^{2+} RyR, pero durante su estado desfosforilado se ha observado que aumenta la probabilidad de apertura del canal

(135). Los receptores de rianodina (RyR) localizados en las CT son los responsables de la liberación de Ca^{2+} durante la activación muscular. Se encuentran en contraposición a las membranas de TT, de las cuales reciben el estímulo para su apertura (Figuras 6 y 7). La parte longitudinal del RS está compuesta casi por completo de bombas o ATPasas de Ca^{2+} (SERCA), que secuestran el Ca^{2+} durante la relajación muscular.

El análisis electroforético de las diferentes fracciones de RS (Figura 11) revela su composición proteica. La SERCA1, de peso molecular 110,000, es la proteína más abundante en la región longitudinal (95%); los RyR de peso molecular 560,000 y la calsecuestrina de 58,000 están localizadas en las CT.

Figura 11. Gel SDS-PAGE. Gel de poli-acrilamida al 10 % con 5 μg de proteína (RS= retículo sarcoplásmico, STD= estándar) por carril, teñido con plata. La banda de 100 kDa corresponde a SERCA, una banda de 58 kDa corresponde a calsecuestrina



Receptores de rianodina. Los

receptores de rianodina están presentes en el retículo endoplásmico de prácticamente todo tipo de célula. Existen tres isoformas, que son el RyR1 (isoforma principal de músculo esquelético, además de cerebro y músculo liso), el RyR2 (isoforma predominante en corazón y cerebro, además de células epiteliales) y el RyR3 (presente en cerebro y músculo esquelético de no mamíferos, músculo liso y células epiteliales). La unión de la rianodina, un alcaloide de bajo peso molecular, a los RyR es dependiente de Ca^{2+} y estimulada por $[\text{ATP}]_{\text{mM}}$. Se ha observado que compuestos como el rojo de rutenio y cationes divalentes como Mg^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , La^{2+} y altas $[\text{Ca}^{2+}]$, inhiben la unión específica de la rianodina. Actualmente se sabe que la rianodina se pega al canal de Ca^{2+} en su estado abierto (28, 64, 96, 113). Bull *et al.* (19) observaron que a bajas concentraciones de rianodina (5 a 10 nM)

se activa el canal de Ca^{2+} por interacción con receptores de alta afinidad ocasionando un mayor tiempo de apertura y, por el contrario, altas concentraciones de rianodina (250 nM) cierran el canal por interacción con receptores de baja afinidad en músculo esquelético rápido. Por microscopía electrónica se observó que los RyR corresponden a homotetrámeros de cuatro subunidades de peso molecular 560,000 cada una (Figura 12), y están asociados a cuatro proteínas de peso

molecular 12,000, conocidas como proteínas fijadoras de FK-506 (FKBP12) (22, 33, 116). Sólo la mitad de los canales RyR1 es activada por los RDHP dependientes de voltaje. Se ha sugerido que FKBP12 induce la apertura acoplada de todos los RyR3 permitiendo que los canales no asociados a RDHP puedan ser regulados (93, 116). El 20% de los residuos de aminoácidos del RyR

corresponde al canal de Ca^{2+} propiamente dicho. Los canales se ubican en un arreglo de doble fila de 10 a 60 canales, de los cuales exactamente la mitad están en contraposición a los sensores de voltaje (RDHP) de los TT (13). En estudios con quimeras de RyR1 y RyR2 expresadas en miotúbulos carentes de RyR1 (dispédicos) se encontró que la región que contiene los residuos 1,635-2,636 de RyR1 es importante para el canal de Ca^{2+} y en el AEC, mientras que la región que contiene los residuos 2,659-3,720 sólo participa en la estructura del canal de Ca^{2+} . Eso mostró que dos regiones diferentes están involucradas en las interacciones recíprocas del RyR1 con el RDHP de músculo esquelético (99).

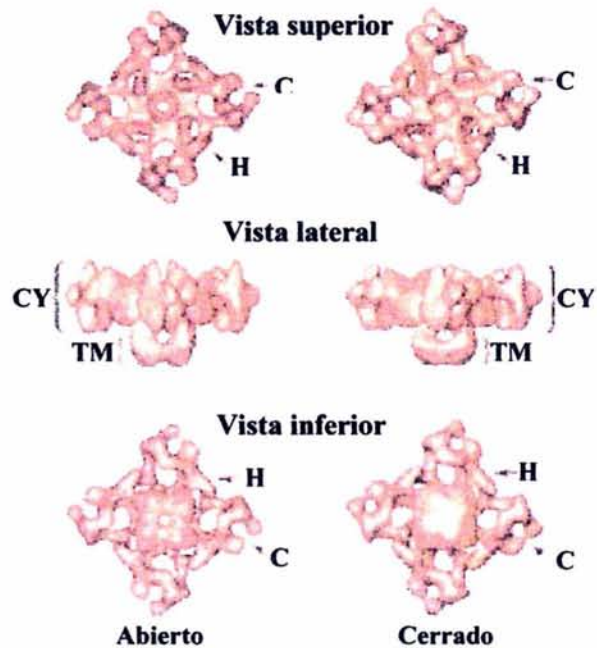


Figura 12. Vistas del RyR en su estado abierto y cerrado. Adaptación de Samsó, 1998 (122).

Mediante estudios de cinética enzimática se tienen evidencias que indican que el homotetrámero del canal de Ca^{2+} (RyR) se regula siguiendo un modelo de cooperatividad alostérica negativa (77, 112, 155). El proceso implica la oxidación de grupos tioles del receptor (134).

ATPasa de Ca^{2+} (SERCA)

La ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) es una bomba de Ca^{2+} que se encuentra en la porción tubular o longitudinal del RS (RSL), y que pertenece a las ATPasas tipo P. Su actividad está asociada a la relajación del músculo, por lo que inicialmente se le conoció como factor relajante. Se encuentra ampliamente distribuida en las fibras rápidas en una proporción de 5 a 7 veces mayor que en fibras lentas (34). Esta proteína ha sido purificada (88), y su estructura primaria (3, 89) y terciaria (140) han sido determinadas. Se han identificado siete diferentes isoformas de SERCA, que son codificadas por tres genes con la posibilidad de edición alternativa y se expresan de manera tejida específica: Son a) SERCA1a de músculo esquelético rápido adulto, b) SERCA1b de músculo esquelético rápido neonatal, c) SERCA2a de músculo esquelético lento y cardíaco, d) SERCA2b de músculo liso y tejido no-muscular y e) SERCA3a,b,c de endotelio vascular, epitelio, linfocitos y plaquetas. SERCA es una proteína anfifílica con regiones citoplasmáticas, transmembranales e intraluminales (Figura 13). Sus tres dominios citoplasmáticos son denominados: 1) el de pegada de ATP (dominio N), 2) el de fosforilación del ácido aspártico catalítico (dominio P), 3) el de transducción de energía (dominio A). Existe una gran homología entre la secuencia primaria de SERCA 1a y SERCA 2a, excepto en las regiones amino y carboxilo-terminales. Se han identificado dos sitios de pegada de Ca^{2+} . El **sitio I** se localiza en el espacio comprendido entre las hélices M5, M6 y M8. Los átomos de oxígeno de las cadenas laterales de los residuos Asn768, Glu771 (M5), Thr799, Asn800

(M6) y Glu908 de la hélice M8 tienen gran importancia en la formación de este sitio. El sitio II está formado casi por completo por la hélice M4, mediante los átomos de oxígeno

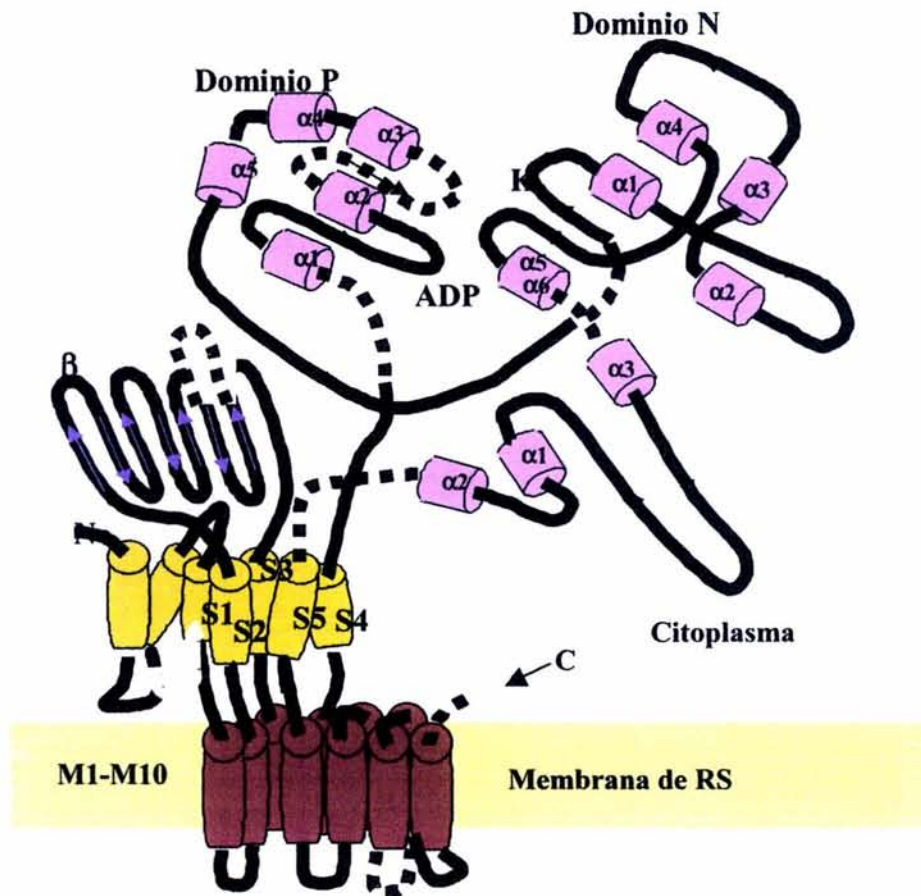


Figura 13. Esquema de la estructura de SERCA. Tiene 10 dominios transmembranales formados por alfa-hélices (M1 a M10.), de las cuales M4, 5, 6 y 8 forman el paso para las moléculas de Ca^{2+} . M3, 4 y 5 podrían formar la vía de salida para el Ca^{2+} hacia la luz del RS. Los tres dominios citoplasmáticos se denominan N (unión de nucleótidos), P (de fosforilación del Asp catalítico), A (actuador) ; C = sitio de unión de Ca^{2+}

de las cadenas carbonílicas de Val304, Ala305 e Ile307, y los átomos de oxígeno de las cadenas laterales de Asn796, Asn800 (M6) y Glu309 (140).

El ciclo catalítico de la SERCA es del tipo E_1, E_2 (Figura 14a). Su estequiometría es la hidrólisis de una molécula de ATP por dos moléculas de Ca^{2+} transportadas al interior del RS (66). La enzima no fosforilada y en ausencia de Ca^{2+} es denominada E_1 . Después de la unión de dos moléculas de Ca^{2+} a los sitios de alta afinidad en el dominio transmembranal

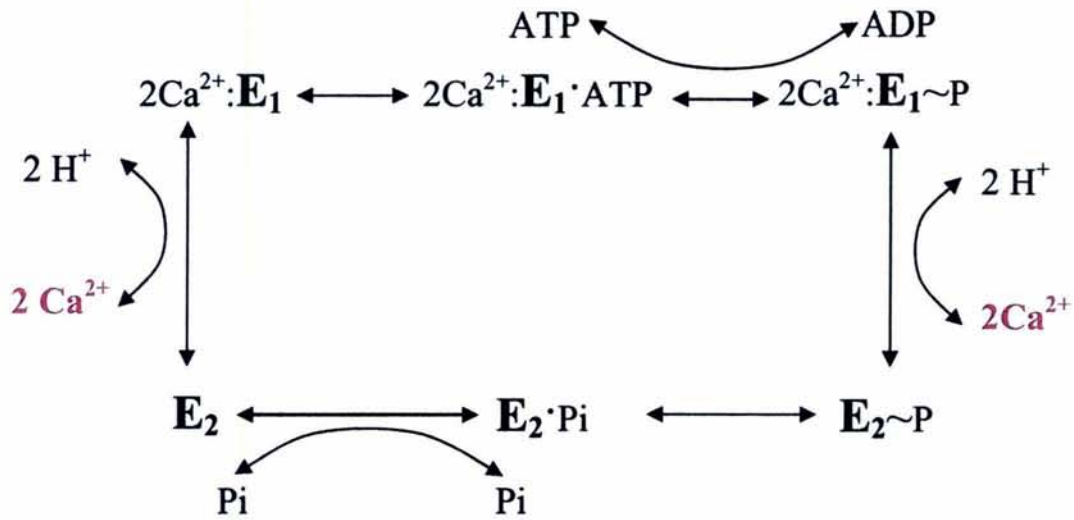


Figura 14 a. Ciclo catalítico de SERCA. El estado E_1 une 2Ca^{2+} y se fosforila con ATP, lo cual cambia la conformación de la enzima para transportar las moléculas de Ca^{2+} a través de su dominio transmembranal. Posteriormente suelta el Ca^{2+} a la luz del RS y adquiere la conformación E_2 libre de Ca^{2+} .

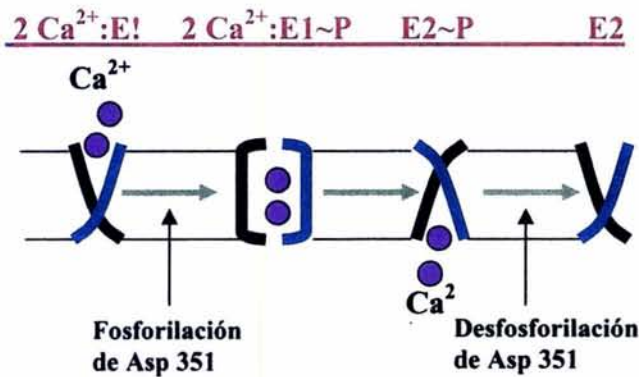


Figura 14 b. Rotación de alfa-hélices transmembranales durante el ciclo catalítico

$(2\text{Ca}^{2+}:\text{E}_1)$ se une una molécula de ATP al dominio N citoplasmático ($2\text{Ca}^{2+}:\text{E}_1\cdot\text{ATP}$). Importantes cambios conformacionales en el dominio N inducen la hidrólisis de la molécula de ATP y la fosforilación de la enzima en el

Asp 351 catalítico del dominio P (Figura 14 b), con la liberación de ADP ($2\text{Ca}^{2+}:\text{E}_1\sim\text{P}$). La fosforilación a su vez causa cambios en la afinidad por el Ca^{2+} ($2\text{Ca}^{2+}:\text{E}_2\sim\text{P}$), y las dos moléculas son liberadas hacia el interior del RS, denominándose el estado de la enzima en este momento $\text{E}_2\sim\text{P}$. Finalmente la proteína se desfosforila (E_2) y queda lista para otro ciclo

catalítico y de transporte (E1). Gracias al transporte de Ca^{2+} de la SERCA en contra del gradiente de concentración, se alcanza una concentración en el interior de RS similar a la del medio extracelular (66, 67).

La dirección del ciclo catalítico de SERCA puede cambiar espontáneamente, resultando en la síntesis de ATP. La dirección de la reacción depende de la energía libre del flujo iónico (depende del gradiente iónico y el voltaje) y la energía libre de la reacción química, que es negativa en la hidrólisis de ATP, y que depende también de las concentraciones de ATP, ADP y Pi. Después de haberse acumulado Ca^{2+} en RS, se forma un gradiente a través de la membrana, lo cual promueve que se revierta el ciclo catalítico. Entonces se produce una salida de Ca^{2+} a través de SERCA acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP y Pi, conocida como flujo de Ca^{2+} acoplado, a diferencia del flujo de Ca^{2+} no acoplado, que no se acompaña de la síntesis de ATP pero donde hay producción de calor a partir de la energía osmótica del gradiente de concentración (30a).

Fosfolamban (FL) en su estado desfosforilado inhibe la afinidad de SERCA por Ca^{2+} . Una cavidad formada por parte de M2, M4, M6 y M9 de SERCA 2a de músculo de corazón y músculo esquelético lento, pero también de SERCA 1a de músculo esquelético rápido (139) es el sitio que interactúa con FL cuando la enzima se encuentra en la conformación E_2 (libre de Ca^{2+}), pero SERCA3 no tiene la capacidad de interactuar con FL.

2. Teorías sobre el Mecanismo del Acoplamiento Excitación-Contracción (AEC)

El AEC consiste en la transmisión de una señal originada por un potencial de acción en las membranas de TT hasta los RyR del RS para desencadenar los eventos que tienen

como finalidad la contracción muscular. Ríos y Brum sugirieron que los RDHP en su función de sensores de voltaje producen movimientos de cargas intramembranales al cambiar el potencial de membrana y desencadenan la liberación de Ca^{2+} de los RyR adyacentes (119). Actualmente se cuenta con más evidencias que proponen que el AEC se produce por contacto directo entre el RDHP y el RyR, aunque esta interacción podría ser estabilizada por la acción de otras proteínas tales como la triadina, mediada por segundos mensajeros, y modulada por diferentes mecanismos, como la fosforilación del RDHP (86) o concentraciones locales de Ca^{2+} . Por otro lado, los canales RyR de fibras musculares esqueléticas y cardíacas son altamente susceptibles a modificaciones por redox que regulan la actividad del canal (56).

2.1 AEC por Interacción directa entre RyR y RDHP

Block *et al.* (1988) presentaron evidencias basadas en imágenes de criofractura que el AEC se lleva a cabo mediante la interacción directa entre RDHP y RyR, formando un complejo que abarca las dos membranas de unión y el espacio intermedio (13). Por otro lado, se ha sugerido que la región Thr671-Leu690 del asa citoplasmático II-III de la subunidad $\alpha 1a$ del RDHP se une de manera voltaje dependiente a un sitio activador del RyR, lo que ocasiona un cambio conformacional instantáneo que resulta en la apertura del canal de Ca^{2+} / RyR del RS (63). Durante la repolarización de los TT, la región bloqueadora del RyR, que comprende los residuos Glu724 a Pro760 reemplaza a la región activadora y hace que el RyR tome su conformación original cerrada. Hay evidencias que muestran que el fragmento Arg1076-Asp1112 del RyR1 interactúa con el asa II-III del RDHP y que los fragmentos Lys954-Phe1075 y Arg1076-Asp1112 del RyR1 interactúan con el asa III-IV

del RDHP (81), lo que es indicativo de que las asas II-III y III-IV del RDHP interactúan con sitios contiguos y posiblemente traslapados entre Lys954 y Asp 1112 del RyR1 (82).

2.2 AEC modulado por Proteínas Intercaladas entre RyR y RDHP

Takekura *et al.* (136) observaron, que, al expresar conjuntamente RyR y RDHP en células de ovario de Hamster (CHO), los RyR formaron canales tetraméricos funcionales con un correcto arreglo en la membrana de RS, mientras que los RDHP no formaron tetradas ni se observaron uniones entre membranas de superficie y de RS, lo que indica que otras proteínas intercaladas podrían participar en el proceso. Se han identificado y parcialmente caracterizado diferentes proteínas ubicadas en la región de la triada, que podrían estar involucradas en la interacción entre RDHP y RyR. Entre estas proteínas están la proteína TS28 de peso molecular 28,000 localizada en los TT y vesículas subsarcolemales, que tiene mayor distribución en las fibras musculares de tipo II (rápidas) que en las de tipo I (lentas) (73), y la proteína transmembranal llamada mitsugumin29 que se encuentra en la triada de músculo esquelético (138). También se ha descrito que el RyR purificado de músculo esquelético se une a una proteína de peso molecular 61,000 presente en los TT aislados (26). Por otro lado, tanto el RyR como el RDHP se unen a la triadina, una proteína de peso molecular 95,000 ubicada en las CT de RS (14,53,75), principalmente de fibras rápidas (53). La expresión de la triadina, al igual que de la calsecuestrina, está suprimida en el músculo rápido que se transforma en lento mediante la estimulación crónica (103). Se ha observado que el dominio citoplasmático de la triadina, que comprende la región entre los residuos 18-46 interactúa con el RyR a bajas concentraciones de Ca^{2+} (51). Sin embargo, en inmunoblots de geles diagonales no se observó sobreposición entre las bandas de triadina, RDHP, RyR y calsecuestrina (40), por lo que Froemming *et al.* sugieren que no existe interacción entre estas moléculas. Murray *et al.* sugieren que la

estabilización de las interacciones entre los receptores RyR y RDHP podría deberse a grupos de moléculas de triadina unidas entre sí por enlaces disulfuro (98), lo que significaría una regulación por redox. Además de la triadina, una proteína de unión llamada junctina podría modular la liberación de Ca^{2+} por los RyR mediante la acción de la calsecuestrina (70). La calsecuestrina es una proteína fijadora de Ca^{2+} que se localiza en el lumen de las CT del RS. Cuando la calsecuestrina está en estado fosforilado no tiene efectos sobre la apertura de los canales de Ca^{2+} RyR, pero durante su estado desfosforilado se ha observado que aumenta la probabilidad de apertura del canal (135). Otras proteínas han sido mencionadas como moduladoras de la apertura de los RyR, tales como la translocasa de ADP/ATP de peso molecular 30,000 del RS que se une a la calsecuestrina (151,152), la proteína FKBP12, que es un componente integral del canal (79), y la calmodulina, una proteína de peso molecular 16,000 que modula la actividad del RyR en forma Ca^{2+} - dependiente. A concentraciones bajas (nanomolares) activa al canal y a concentraciones altas (micromolares) inhibe al canal (142).

2.3 AEC modulado por el Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) como segundo mensajero

El IP_3 es una molécula ubicua que se produce y libera en la membrana plasmática como respuesta a la estimulación extracelular de receptores específicos. Se ha estudiado la posibilidad de que esté involucrado en el AEC de músculo esquelético, ya que se encontró actividad hidrolítica de una IP_3 -fosfatasa en membranas de TT y, en menor grado, en RS de músculo esquelético de rana (129). También se observó en los TT la fosforilación de fosfatidilinositol a fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, que es un intermediario en la síntesis de IP_3 (57). La detección de altas concentraciones de este segundo mensajero en las triadas y los TT (59) ha llevado a suponer la posible participación del IP_3 en el AEC (57). El efecto activador del IP_3 sobre los canales de Ca^{2+} sensibles a la dihidropiridina en TT de músculo

rápido de conejo (144) y la liberación de Ca^{2+} de CT del RS (145) sugieren que el IP_3 es capaz de modular los canales de Ca^{2+} de los TT de músculo esquelético. Aunque Suárez-Isla *et al.* (133) observaron la activación de la salida de Ca^{2+} por IP_3 en membranas aisladas de RS, se propone que el IP_3 tiene un receptor diferente al RyR, que puede ser coexpresado con el RyR en diferentes tipos de células. Tanto RyR como el receptor del IP_3 están controlados por las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . Mientras se propone que la Ca^{2+} -dependencia del RyR tenga que ver con el AEC en músculo cardiaco, la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 se relaciona más bien con la generación de ondas lentas de Ca^{2+} en neuronas y músculo liso (68). La presencia de receptores de IP_3 en las membranas de la triada en músculo esquelético rápido podría indicar que estén involucrados en el AEC del tejido muscular, sin embargo, no ha sido totalmente documentado.

2.4 AEC modulado por Ca^{2+} como segundo mensajero en músculo esquelético

En el AEC del músculo esquelético están involucrados principalmente los homotetrámeros RyR1 que interactúan con tétradas de RDHP de los cuales reciben la señal a través de su función de sensor de voltaje. Como homotetrámero, el RyR1 es una proteína alostérica, cuya tendencia de abrir aumenta en un factor igual por cada sensor de voltaje (RDHP) que se mueve al estado activador (120). Además de recibir la señal primaria de acople alostérico de los RDHP, los RyR1 también transmiten una señal retrógrada que cambia la dependencia del movimiento de cargas en el RDHP con el voltaje (120) y estimula la actividad de canal de Ca^{2+} de los RDHP (99). Stern *et al* hablan de una liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} bajo el control del voltaje, según el cual moléculas de Ca^{2+} liberadas por los RyR interactúan con sitios activadores e inactivadores de otros RyR (132), de forma similar a la que podría ocurrir mediante la acción de proteínas moduladoras entre RDHP y RyR. Eso indica que el control dual de la liberación de Ca^{2+} por los RyR

podría ser dirigido primariamente por voltaje siguiendo un modelo alostérico y secundariamente amplificado por Ca^{2+} (119, 120, 132). Anderson y Meissner observaron que la liberación de Ca^{2+} por RyR inducida por la despolarización de TT comprende una fase inicial rápida seguida por una lenta e indicaron que la fase rápida está controlada por mecanismos dependientes del potencial de membrana de TT y por mecanismos dependientes del Ca^{2+} (4).

3. Adaptación al Ejercicio

El músculo esquelético es un tejido altamente sensible dependiendo de sus requerimientos funcionales. Los cambios bioquímicos, histológicos y fisiológicos en las fibras musculares, que se desprenden de estimulación constante y que modifican su función comprenden en su conjunto la adaptación del músculo esquelético al ejercicio.

El funcionamiento muscular modificado por la adaptación al ejercicio incluye los siguientes cambios: 1) Metabólicos, como la capacidad oxidativa del tejido y cambios en las concentraciones intracelulares de electrolitos y metabolitos como ATP, Pi, lactato y en el pH (62), 2) En el aparato contráctil, particularmente en las isoformas de la cadena pesada de la miosina (29,41,102,104,114), 3) En la cantidad, actividad e isoformas de las proteínas reguladoras de la $[\text{Ca}^{2+}]$, como las bombas de Ca^{2+} , los canales de calcio RyR, la calsecuestrina (41), entre otros, y 4) En las proteínas involucradas en la despolarización (receptor de acetilcolina) (102) y la repolarización (bombas de Na^+/K^+) de las membranas de superficie, como en el AEC (RDHP) (41,111).

La adaptación del tejido muscular al ejercicio se puede lograr mediante las siguientes maneras experimentales: 1) A través de la estimulación crónica de una

inervación muscular a una frecuencia baja y durante las 24 horas del día con un electrodo implantado. El estímulo puede ser aplicado durante varias semanas o meses, como ha sido descrito ampliamente (29,41,102,104,111,114), 2) A través de un protocolo de ejercicio (entrenamiento), utilizando una banda sin fin o una bicicleta fija (48).

3.1 Estimulación Crónica de Baja Frecuencia (ECBF)

Este modelo de investigación se ha utilizado para observar las respuestas del tejido muscular a una actividad neuromuscular en condiciones de máxima actividad (29,41,102,104,111,114), y al aplicarla a músculos que componen predominantemente a las fibras de contracción rápida (tipo II). Se ha observado una reorganización extensa y transformación de fibras rápidas (tipo II) a fibras lentas (tipo I), acompañado de una serie de cambios en las isoformas de las principales proteínas (29,41,102,104,111,114). Las células producto de la ECBF presentan un diámetro menor, una mayor capacidad aeróbica-oxidativa, mayor resistencia a la fatiga y mayor tiempo umbral a la tensión máxima de contracción.(2). A nivel molecular, hay un reemplazo gradual de las cadenas pesadas de la miosina de las isoformas más rápidas IIb a IId(x) a IIa, a la isoforma I, que es la más lenta (29,41,102,104,114). En el sensor de voltaje RDHP hay una disminución en la cantidad de proteína, en comparación con los músculos rápidos, consistente con los niveles más bajos de RDHP encontrados en músculos lentos, además de que hay un reemplazo gradual de la isoforma esquelética rápida por la cardíaca que es más lenta (41,111). También se observa una disminución drástica en la expresión de RyR1 y la aparición de RyR2 (41), el reemplazo de la calsecuestrina rápida por la isoforma lenta (41) y de SERCA 1 de músculo esquelético rápido por SERCA2 de músculo esquelético lento y cardíaco (15). La actividad hidrolítica de la SERCA1 y la captura de Ca^{2+} por RS disminuyen después de la ECBF (15). Recientemente se ha reportado que la ECBF produce cambios a nivel de la unión

neuromuscular, aumentando las concentraciones de las subunidades α y δ del receptor de acetilcolina y produciendo cambios a nivel del complejo de proteínas que estabilizan la formación de la unión neuromuscular a través de la comunicación entre el citoesqueleto subsarcolemal y el matrix extracelular (102). Estas estructuras representan el primer elemento en el AEC de músculo esquelético, asumiendo el patrón de estimulación neuromuscular un papel determinante en la definición del fenotipo muscular (114).

3.2) Entrenamiento

A pesar de que la ECBF ha sido importante en el estudio de la plasticidad del tejido muscular, no es una estimulación fisiológica. Como modelo fisiológico se usa la actividad voluntaria del entrenamiento para obtener una adaptación al ejercicio, aunque los cambios observados son menos extensos. El ejercicio rutinario es seguido por un periodo de recuperación y los protocolos pueden variar en intensidad y duración, produciendo cambios diferentes. Los protocolos pueden ser 1) de larga duración con una intensidad moderada, creando mayor resistencia a la presentación de la fatiga muscular, o 2) de menor duración y mayor intensidad, logrando mayor velocidad o carga de peso. El ejercicio de alta intensidad está acompañado por un aumento en la masa del tejido muscular (hipertrofia) (49), gracias al aumento en la cantidad de las proteínas contráctiles, mientras que el ejercicio de resistencia ocasiona poco aumento de volumen. El entrenamiento, tal como la ECBF, puede producir una transición del tipo de fibra muscular de rápido a lento y de las isoformas de la miosina, aunque en un rango menor (50). Después de un entrenamiento de "sprint", se observó en músculo rápido de humano en reposo una elevada liberación de Ca^{2+} de RS y un aumento en la cantidad total de RyR sin cambios en su densidad, debido a un aumento en el volumen total de RS (108). Las actividades específicas de captura de Ca^{2+} y ATPasa de

Ca^{2+} de RS permanecieron sin cambios, a pesar de un aumento en las densidades relativas de SERCA1 y SERCA2 (108). Por otro lado, en músculo rápido de humano (85) y de rata (66) en reposo, después de un entrenamiento de alta intensidad, se ha reportado una disminución en la captura de Ca^{2+} por RS, sin que ésta función sufra mayor descenso durante el ejercicio (65). Esta observación es congruente con observaciones hechas en caballos (151) y humanos (49), en donde el entrenamiento de alta resistencia atenúa la pérdida en la función hidrolítica y de captura de Ca^{2+} de SERCA1 durante el ejercicio, proporcionándole al músculo de esta manera una mayor resistencia a la fatiga. A pesar de que el entrenamiento tiene un efecto menos marcado que la ECBF, Green *et al* (48) determinaron, que el entrenamiento submáximo aeróbico de músculo rápido de humano puede resultar en una disminución en la liberación y captura de Ca^{2+} por RS, asociada a una disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la pierna entrenada comparada con la de control, y en una disminución en la cantidad de SERCA1, pero no de SERCA 2a. Estas observaciones son comparables con los estudios de ECBF, donde la disminución en la cantidad de SERCA2 ocurre posteriormente a la de SERCA1 (104). Todos estos cambios en ambas condiciones son consistentes con una transformación de fibras rápidas a lentas, las cuales al tener una menor tasa de circulación de Ca^{2+} a través del RS, estarán asociadas a un gasto menor de energía.

Durante la actividad contráctil intensa existe una modificación no sólo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sino también otros electrolitos se encuentran modificados. La $[\text{K}^+]_i$ disminuye en un 10-20% y la $[\text{K}^+]$ intersticial y plasmática aumentan, resultando en una despolarización de membrana en 20 mV, debido a un transporte insuficiente de Na^+ y K^+ (47, 76, 94, 100). La enzima que regula la homeostasis de los gradientes iónicos de Na^+ y K^+ durante la actividad

muscular es la Na^+/K^+ -ATPasa de la SL y los TT implicada en la repolarización de las membranas de superficie después de la activación. La actividad de esta enzima, al igual que la de SERCA, se modifica por la actividad contráctil sostenida, sin embargo, la recuperación de su función es mucho más rápida que la de SERCA (47). Como se ha visto en estudios de pegada de ouabaina (47, 76) e inmunoblots (100), el entrenamiento eleva la cantidad de Na^+/K^+ -ATPasas en músculo esquelético de diferentes especies y disminuye la salida de K^+ al espacio extracelular durante el ejercicio en ambos tipos musculares (100). La pérdida de la actividad muscular inducida por denervación resulta en una disminución del 20-30% en la pegada específica de ouabaina (76).

Los cambios metabólicos relacionados con el mejoramiento en el transporte de glucosa al interior de la célula (100) durante la adaptación del músculo al ejercicio, no serán discutidos en este trabajo, debido a que no están directamente relacionados con proteínas de membrana que regulan las $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

4. Fatiga Muscular

La fatiga muscular se define como la disminución en la fuerza de contracción durante una actividad muscular prolongada. Es un fenómeno fisiológico reversible, multifactorial e incluye los siguientes aspectos: 1) metabólicos, 2) membranales y 3) de las proteínas contráctiles. Los eventos en donde se podría originar la fatiga incluyen el sistema nervioso central, las alfa-motoneuronas, la placa neuro-muscular, la sarcolema y las estructuras relacionadas con el AEC, que involucraría a todos los componentes de los TT y el RS, además de las proteínas contráctiles y el citoesqueleto.

En la fatiga muscular hay una propagación adecuada del potencial de acción hasta los TT (18), y las alteraciones metabólicas que resultan de una actividad prolongada se restablecen antes de que se recupere la fuerza de contracción (7). La recuperación de la fatiga se realiza en dos fases: a) una rápida que ha sido atribuida al restablecimiento de los gradientes transmembranales de sodio y potasio mediante la acción de la ATPasa de Na^+/K^+ (37), y una lenta que corresponde a la recuperación de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. Tanto en el AEC como en los eventos intracelulares, los movimientos del Ca^{2+} son un factor de activación fundamental, y en la fibra en reposo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está básicamente regulada por la liberación y captura de Ca^{2+} por el RS. La fatiga en músculo esquelético rápido se ha asociado a una disminución en la actividad de captura de Ca^{2+} (10, 20, 39, 155) y/o hidrolítica (20, 39) de la SERCA1, que podría tener como consecuencia la elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (150), así como, en etapas avanzadas, a una disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (147), como consecuencia de la disminución en la liberación de Ca^{2+} por los RyR (27, 36). Sin embargo, la disminución en la liberación de Ca^{2+} por los canales de Ca^{2+} RyR puede tener varias explicaciones: 1) una falla en la transmisión de la señal entre los RDHP y los RyR (*desacoplamiento*), 2) una disminución en la probabilidad de apertura de los RyR por una inactivación de los mismos o 3) una disponibilidad reducida de Ca^{2+} en la luz del RS. La exposición a cafeína de fibras musculares peladas fatigadas produjo contracturas adecuadas, lo que significa que en el interior del RS hay disponibilidad de Ca^{2+} (2, 78).

4.1) Disminución en la liberación de Ca^{2+} por los RyR debido a una falla en la transmisión de la señal de TT a RS

La actividad muscular producida por estimulación eléctrica y la fatiga han sido relacionadas a una disminución en los gradientes transmembranales de Na^+ y K^+ , debido a

la salida excesiva de K^+ a la luz de los TT y la entrada de Na^+ al espacio intracelular. Se ha reportado que en la actividad muscular prolongada, la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ podría resultar insuficiente para restaurar el potencial de membrana. Esto provocaría una despolarización de la membrana de $-80mV$ a $-60mV$ (8,67), voltaje para el cual la fibra se encuentra menos excitable, ya que requiere de un potencial de membrana menor a $-70mV$ para que suficientes canales de Na^+ y K^+ se abran (8, 115). Por otro lado, se ha propuesto que la unión de Ca^{2+} a un sitio extracelular del RDHP es indispensable para que se lleve a cabo el movimiento de cargas, que desencadena la activación de los RyR; sin embargo, la despolarización del potencial de membrana disminuye la afinidad del sensor de voltaje por el Ca^{2+} (115). Una baja concentración de Ca^{2+} extracelular $[Ca^{2+}]_e$ se asocia a una disminución en el movimiento de cargas en el RDHP y en la salida de Ca^{2+} de los RyR (16, 17), y a la exacerbación de la fatiga producida por estimulación tetánica en músculo lento (35) y a una mayor incapacidad para mantener la tensión tetánica máxima, especialmente en fibras con una resistencia inicial alta a la fatiga (117), por lo que estas fibras podrían tener una mayor dependencia de las $[Ca^{2+}]_e$. La presencia de un antagonista de los canales de Ca^{2+} , como la nifedipina resulta en una incapacidad para mantener la tensión tetánica máxima (109). Una disminución en la disponibilidad del Ca^{2+} en la luz de los TT podría ocurrir por una disminución en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de los TT y por la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje durante la despolarización, lo cual elevaría la $[Ca^{2+}]_i$ (4,5). Altas $[Ca^{2+}]_e$ revirtieron la disminución en la fuerza de contracción inducida por una elevada $[K^+]_e$ en músculo rápido (21). Por otro lado, se ha propuesto que una salida elevada de Ca^{2+} a la luz de los TT como resultado de la estimulación eléctrica repetida pudiera causar una falla en la propagación del potencial de acción (9,12); y

algunos estudios indican que el Ca^{2+} extracelular no está involucrado en el AEC de músculo esquelético (5,46).

Nuestros resultados indican que en el músculo adaptado al ejercicio existe un aumento en el transporte de Ca^{2+} a través de las membranas de los TT, lo que resulta en una disminución en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y un probable aumento en la luz de los TT. La proporción de ATPasas de Ca^{2+} en los TT es del 2% de las proteínas totales, mientras que en el RS es del 75-90%. Aunque la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de los TT se triplicó y la del RS no está modificada, en proporción, el transporte de Ca^{2+} por el TT es insuficiente para cambiar las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y $[\text{Ca}^{2+}]_e$, por lo que este aumento en el transporte podría estar relacionado con un efecto más local.

4.2) Disminución en la liberación de Ca^{2+} por acción directa sobre el canal de Ca^{2+} /RyR

Se han propuesto tres posibles factores que podrían tener un efecto directo sobre los RyR y contribuir al desarrollo de la fatiga: a) una elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$, b) la acción de radicales libres y c) alteraciones en los metabolitos y las moléculas que se encuentran en el espacio de la triada; todos estos cambios siendo el efecto de la actividad contráctil del tejido.

4.2.a) Falla en la apertura del RyR debido a una elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Diversas evidencias experimentales han mostrado que una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a niveles micromolares inhibe la apertura de los RyR (95) y resulta en una liberación disminuida de Ca^{2+} por RS (150). Por otro lado, la estimulación eléctrica repetida causa una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que podría estimular la salida de Ca^{2+} a la luz de los TT mediante la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} (12). Una actividad aumentada de esta enzima puede elevar la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la luz de los TT ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{TT}}$) de manera local. Se ha mostrado que la aplicación extracelular de 10 mM de Ca^{2+} atenúa la fatiga producida por estimulación tetánica

repetida, y una disminución en la $[Ca^{2+}]_e$ exacerba el estado de fatiga (21), sugiriendo que una elevada $[Ca^{2+}]_e$ podría proteger contra la fatiga en lugar de inducirla, como ha sido previamente propuesto, y que una depleción de Ca^{2+} en TT pudiera contribuir a la fatiga. Sin embargo, estos estudios son incompletos y controversiales por la cantidad de evidencias bien documentadas que indican que el Ca^{2+} extracelular no es esencial para el AEC en músculo esquelético (5,46).

4.2.b) Falla en la apertura del RyR debido a la acción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y derivados del óxido nítrico (ON)

Los radicales libres son cualquier molécula que contenga uno o más electrones que ocupen una órbita atómica por sí solos. Se forman al perder o ganar un solo electrón, cuando haya ruptura de un enlace covalente y un electrón de cada par se va con cada uno de los productos. Ejemplos son O_2^- , OH^- , H_2O_2 y OCI^- . Las ERO y los derivados del ON son moduladores fisiológicos de la función contráctil de músculo esquelético. Su producción es a través del sistema de transporte electrónico en las mitocondrias y el sistema de la xantina oxidasa (35). Las vías de defensa contra las ERO son sistemas enzimáticos como la dismutasa del anión superóxido (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX), cuyas concentraciones se han reportado elevadas durante la adaptación al ejercicio (35), y los mecanismos no enzimáticos comprenden a moléculas de bajo peso molecular como péptidos (glutatión), grupos SH y las vitaminas A, B₆, C y E. El daño que eventualmente ocasionan durante la actividad y la fatiga (35) puede prevenirse con el uso de antioxidantes. Durante el reposo, los mecanismos antioxidantes superan a los oxidantes, por lo que el medio intracelular se encuentra reducido en ERO, pero durante el ejercicio esta relación se invierte ya que el consumo mitocondrial de oxígeno se eleva veinte veces (35). La

producción de las ERO se eleva en cualquier tejido durante el estrés oxidativo y en el músculo durante el ejercicio. Estas especies reactivas son capaces de oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. En especial hay destrucción de ácidos grasos insaturados que son importantes para la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares y el funcionamiento de las proteínas de membrana. La pérdida de los ácidos grasos insaturados resulta en la pérdida de la integridad de la membrana y puede causar la salida de iones como Mg^{2+} y Ca^{2+} .

En el músculo esquelético rápido se expresan tres isoformas de la sintetasa del óxido nítrico, que son la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), que dependen del Ca^{2+} , y la inducible (iNOS), que es independiente del Ca^{2+} . La nNOS se ubica en la sarcolema y está asociada con el complejo de la distrofina conocido como costámeros, en las fibras de músculo esquelético rápido, y la eNOS está asociada a las mitocondrias (42). En las enfermedades inflamatorias se puede inducir la expresión de iNOS que produce ON en una proporción mucho más alta que las otras dos isoformas. Se ha demostrado que la producción de ON también se eleva durante la actividad muscular (18) y que disminuye la fuerza de contracción (129). El ON reacciona rápidamente con el anión superóxido para formar varios radicales libres, como el peroxinitrito, que es capaz de producir daño oxidativo y nitrosativo. Los derivados del ON tienen alta selectividad por los grupos tioles de proteínas como el RyR y la SERCA (34). Mientras que bajas concentraciones de ON inhiben la oxidación de ciertos tioles del RyR y el canal se cierra, altas concentraciones lo abren, posiblemente a través de la oxidación de tioles vecinales para formar puentes bisulfuros (resultados de la Dra A.Ortega no publicados). Opuesto al efecto del ON en los RyR, altas concentraciones de H_2O_2 inhiben el canal y bajas concentraciones lo activan. El transporte de Ca^{2+} a través de la SERCA1 es inhibido por altas concentraciones de ON, a

través de la oxidación de los tioles y la nitrosilación de residuos de tirosina. Los efectos de las ERO y el ON sobre las proteínas del RS tienen como consecuencia la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$. La presencia de concentraciones elevadas de Mg^{2+} inhibe a los RyR, y se ha considerado que el efecto del Mg^{2+} sobre la liberación de Ca^{2+} se debe a la oxidación de un grupo tiol presente en el canal (69). La regulación del potencial redox está dada principalmente por el sistema amortiguador glutatión reducido/glutatión oxidado (GT-SH/GT-SS). La oxidación del GT-SH ocurre en especial durante el ejercicio (3).

4.2.c) Falla en la apertura de los RyR debido a alteraciones en los metabolitos de la actividad muscular en la triada

Durante la actividad muscular prolongada la concentración de lactato aumenta e inhibe la liberación de Ca^{2+} por el RS (36) ocasionando una disminución de la tensión muscular aún en ausencia de cambios en el pH (61). La disminución en el pH intracelular también se ha relacionado con el inicio de la fatiga debido a la inhibición del aparato contráctil (38). Sin embargo, se ha observado que la fuerza de tensión es restaurada antes que el pH, lo que aparentemente indica que no hay una relación directa entre ambos eventos (35). La concentración del ATP intracelular ($[ATP]_i$) global no se reduce al momento de ser iniciada la fatiga, aunque los cambios en la $[ATP]$ en la triada podrían ser diferentes a las $[ATP]$ globales, debido a la síntesis y el consumo localizados de la triada (18, 54). El fosfato inorgánico producto de la hidrólisis del ATP se ha relacionado con una disminución en la actividad de la SERCA y en la apertura de los RyR. Por otro lado, el ATP producto de la oxidación de la glucosa sirve de sustrato a las ATPasas de la fibra muscular que lo hidrolizan durante la relajación muscular, y es un activador de los RyR. Sin embargo, cambios en la concentración de ciertos metabolitos en la triada son causas poco probables

del aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y de la fatiga, ya que se ha visto que la recuperación metabólica y la recuperación de la fuerza tienen diferente curso de tiempo, en el sentido de que la fatiga se recupera más lentamente (7).

HIPÓTESIS

Múltiples evidencias indican que el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ es el evento que inicia los cambios observados durante la actividad prolongada que lleva a la fatiga, por lo que proponemos que en el músculo adaptado al ejercicio las bombas de Ca^{2+} de RS y TT, que son las membranas involucradas en el AEC, pudieran estar modificadas para regular mejor la $[Ca^{2+}]_i$ libre y mantener su homeostasis. Cambios conformacionales y en consecuencia en la actividad de estas enzimas, que pudieran experimentar durante estos procesos tendrían como consecuencia una disminución en la actividad de transporte de la SERCA1, resultando en un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo cual pudiera disminuir la capacidad de contracción, o en un aumento en la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} de los TT para disminuir la $[Ca^{2+}]_i$.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

- Determinar el efecto de la fatiga muscular y la adaptación al ejercicio sobre la actividad de transporte de Ca^{2+} y la conformación de las ATPasas de Ca^{2+} de RS y TT de músculo esquelético.

Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de adaptación al ejercicio para producir resistencia a la fatiga en conejos
- Establecer el método *in vivo* para producir fatiga en músculo esquelético rápido de conejo
- Aislar membranas purificadas de RS y TT de músculo esquelético rápido de conejo control, adaptado al ejercicio y fatigado
- Determinar las actividades de transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP y de hidrólisis por las ATPasas de Ca^{2+} de RS y TT de membranas aisladas de músculo esquelético control, adaptado al ejercicio y fatigado
- Determinar por medio de estudios de calorimetría diferencial de barrido los cambios en los parámetros termodinámicos de las principales proteínas de las membranas aisladas del RS y de TT de músculo esquelético control, adaptado al ejercicio y fatigado, con el fin de evidenciar diferencias estructurales en las diferentes condiciones fisiológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Protocolo de adaptación al ejercicio

Se utilizaron conejos machos blancos de la raza Nueva Zelanda. El grupo control y experimental provinieron de la misma camada. Los controles se mantuvieron sedentarios hasta las 14 semanas de edad. El grupo de adaptación al ejercicio se entrenó a partir de la semana 6 hasta la semana 14 de edad. El entrenamiento consistió en hacerlos caminar sobre una banda sin fin durante cinco días a la semana (Figura 15). Durante la primera semana las sesiones diarias duraron 10 min trabajando a una velocidad de 5 a 11 m/min para habituar a los animales a caminar en la banda. En las semanas siguientes las sesiones de ejercicio aumentaron progresivamente, tanto en duración como en velocidad, hasta completar 30 min a velocidades de 19 a 24 m/min, alternadas con velocidades lentas de 8 a 11 m/min. Conforme avanzó el programa se aumentaron los periodos de entrenamiento a velocidades rápidas y disminuyeron las lentos. Según las capacidades de cada animal se hicieron ajustes individuales al protocolo. A las 14 semanas de edad los conejos control y experimental se sacrificaron por dislocación cervical. Se usaron los músculos esqueléticos rápidos de las piernas traseras para el aislamiento de membranas de TT y RS. Para todos los experimentos se usó un número de animales $n = 3$.

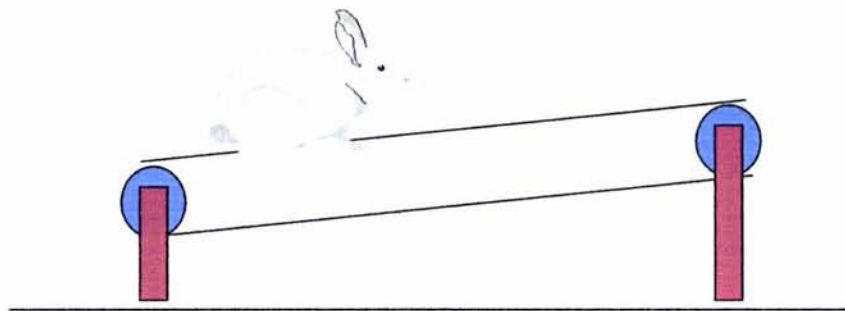


Figura 15. Conejos adaptados al ejercicio en una banda sin fin

2. Protocolo para obtener músculos tibiales anteriores, extensores digitales largos y gastrocnemios blancos fatigados

Animales : Conejos machos de la raza Nueva Zelanda de tres meses de edad (2.7 kg) se tranquilizaron con ketamina (0.5 ml) y posteriormente se les aplicó anestesia general por vía intravenosa con pentobarbital sódico (1 ml). En la pierna derecha, se hizo un corte diagonal en la piel a la altura de la rodilla y se separaron los músculos hasta aislar y cortar el nervio femoral. El nervio se fijó a un electrodo de platino conectado a una unidad de aislamiento de estímulos SIU5 y éste a su vez a un estimulador tipo Grass S88. Al terminar el protocolo de estimulaciones, los animales se sacrificaron con cloroformo e inmediatamente después se extrajeron los músculos gastrocnemio blanco, tibial anterior y extensor digital largo. Los músculos de las piernas izquierdas fueron tomados para control. Fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -78°C para el aislamiento de membranas de RS y TT.

Estimulaciones eléctricas : Las estimulaciones tetánicas se realizaron a una frecuencia de una cada 5seg mediante contracturas simples de 80 Hz, 9 V y 0.8 ms en series de 40, 60 y 110 estímulos tetánicos con intervalos de recuperación de 8 y 5 minutos respectivamente.

Registros de contracciones musculares por estimulación eléctrica

La fuerza de las contracciones fue registrada mediante un *Flatbed recorder* (LEM, *Servogor 102*), que mide la fuerza de contracción en función de voltaje, el cual fue convertido a gramos mediante una curva estándar. La fuerza específica P se calculó mediante la ecuación:

$P = \text{Fuerza(g)} / \text{Área(cm}^2\text{)}$, dónde el área $A = \text{Masa} / \text{Longitud} \times \text{Densidad específica}$.

3. Aislamiento de vesículas de membranas de RS ligero y TT

El aislamiento de las membranas de TT se basó en el método descrito anteriormente (121). Los conejos se sacrificaron mediante dislocación cervical y se disecaron los músculos seleccionados. Los músculos se limpiaron de tejido conjuntivo y se cortaron en trozos de 3 cm². Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo o a 4°C. El tejido se homogenizó con una licuadora en una solución que contenía (en mM) 100 KCl, 1 DTT y 20 Tris-malato pH 7.0 (solución amortiguadora A), en una relación de 1:4, durante 30 seg, se reposó 10 seg y se homogenizó nuevamente otros 20 seg. Este material se centrifugó en tubos de 250 ml en un rotor Sorval *GSA* a 3000g (7500 rpm) durante 30 min, el sobrenadante se filtró a través de 8 capas de gasa, se le añadió KCl sólido a una concentración final de 0.5 M para solubilizar las proteínas contráctiles, se centrifugó en un rotor Beckmann *Ti-45* a 150,000g (44,000 rpm) durante 45 min y se descartó el sobrenadante. Para lavar el excedente de KCl, se resuspendió nuevamente el precipitado en solución A y se centrifugó en un rotor *Ti-45* a 44,000 rpm durante 45 min. El precipitado final se homogenizó en una solución que contenía (en mM) 300 Sacarosa, 1 DTT y 20 Tris-malato pH 7.0 (solución amortiguadora B) y esta fracción microsomal se colocó sobre gradientes discontinuos de sacarosa compuestos por tres concentraciones: 25%, 27.5% y 35% (p/v), que se centrifugaron en un rotor *SW-28* a 85,000g (23,000 rpm) durante 16 h. Al terminar, se separaron las diferentes interfases y se lavó el exceso de sacarosa en solución A por medio de una centrifugación a 44,000 rpm durante 45 min. Los precipitados de las fracciones lavadas se resuspendieron en solución B y se congelaron las alícuotas en nitrógeno líquido para almacenarse a -78°C.

La fracción aislada en la interfase 25/27.5% contenía la mayor actividad de Mg^{2+} -ATPasa y correspondió a vesículas de TT. Por este procedimiento se aíslan preferentemente vesículas de TT orientadas con la cara citoplasmática hacia el exterior (inside-out). La fracción de la interfase 30/35% contenía la mayor actividad de Ca^{2+} -ATPasa, pero poca calsecuestrina y correspondió a RS ligero. La fracción de la capa 35% tuvo la mayor capacidad para unir la rianodina por lo que se concluyó que correspondió al RS pesado con cisternas terminales.

4. Determinación de la concentración de proteína

Se usó el método de Bradford. La unión del colorante *Azul de Coomassie* a la proteína desvía la absorción de la luz visible de 465 a 595nm. La densidad óptica fue monitoreada a 595nm con cantidades crecientes de proteína y se comparó con mediciones de cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (ASB) graficadas en una curva estándar, de 5 a 30 $\mu\text{g/ml}$.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se utilizaron geles de acrilamida al 8 o 10% (gel separador: TrisHCl 375mM pH 8.75, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y Temed 0.1%). El gel concentrador se preparó con: acrilamida al 6%, TrisHCl 125mM pH 6.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.1% y Temed 0.1%. La solución amortiguadora de corrida contenía Tris /HCl 25mM (pH 8.3), Glicina 192mM y SDS 0.1%. A cada pozo se agregaron 10 μg de proteína disuelta con el reactivo de Lämmli (Tris/HCl 0.0625 M, SDS 2%, Glicerol 10%, 2-Mercaptoetanol 5% y Azul Bromofenol 0.0001 %) a una proporción de 1:1 de muestra y reactivo. Los estándares de los pesos moleculares (Combithek) usados eran de 170, 116, 85, 55, 39, 27, 20 y 14 kDa. Los geles se corrieron a 60 V constante el gel concentrador y a 120 V constante el gel

separador y se tiñieron con Azul de Coomassie o con plata. Para teñir con Azul de Coomassie se colocaron en una solución con 25% de metanol, 10% de ácido acético glacial y 0.1% de Azul de Coomassie (24 horas) y se destiñeron en una solución equivalente pero sin el colorante. Para la tinción de plata se fijaron los geles en 40% de metanol con 5% de formaldehído durante una hora. Se lavaron dos veces con agua desionizada y se colocaron un minuto en una solución de $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.02%. Se lavaron dos veces con agua desionizada y se colocaron durante 15 min en AgNO_3 al 0.1%. Se enjuagaron y se colocaron en la solución reveladora (3% de Na_2CO_3 , 0.05% de formaldehído y 0.0004% de Na_2SO_3). Cuando se veían claramente las bandas del gel se paraba el proceso de revelado con ácido cítrico 2.3M.

6. Anticuerpos

Se adquirieron anticuerpos policlonales de borrego contra RDHP a1 de músculo esquelético de (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Los anticuerpos policlonales de ratón contra SERCA1 (A52) fueron una donación del laboratorio del Dr DH MacLennan (Universidad de Toronto, Canadá). Como anticuerpos secundarios se utilizaron conjugados de peroxidasa anti-borrego de (Sigma, Dorset, UK) y anti-ratón de (KPL, Gaithersburg, MD), respectivamente.

7. Inmunoelectrotransferencia

Después de separar las proteínas por electroforesis, se fueron electrotransferidas sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond-C-extra, Amersham Life Science,). El bloqueo de la membrana se realizó en la solución PT (PBS con Tween 20 al 0.5%) con leche descremada al 5%. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en PTB (PT con azida de sodio al 0.025% y BSA fracción V al 1%)

durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-RDHP se usó a una dilución del 1/1000, y el anticuerpo anti-SERCA1 a una dilución del 1/240,000. Los anticuerpos secundarios anti-borrego y anti-ratón se usaron a diluciones del 1/1400 (0.7 µg/ml) y 1/3000 (0.33 µg/ml), respectivamente, en PT. Las bandas de proteína se detectaron mediante el método de quimioluminiscencia, usando Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Boston).

8. Determinación de la captura de calcio dependiente de ATP

Se midió el transporte de calcio por filtración de [$^{45}\text{CaCl}_2$] residual en las vesículas. Se incubaron muestras de membranas a una concentración de 0.1mg de proteína/ml a temperatura ambiente en una solución que contiene (mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 CaCl₂ marcado con $^{45}\text{CaCl}_2$, 20 Tris malato (pH 7.0), y en el caso de RS, con y sin 5 oxalato. La reacción se inició agregando 4 mM de ATP-Tris, y se paró a diferentes tiempos con una solución que contiene (mM): 5 MgCl₂, 4 EGTA y 20 Tris-malato pH 7.0, colocando los tubos en hielo antes de filtrar con filtros Millipore de nitrocelulosa de 0.45µm y lavar las membranas con 15ml solución que contiene 10 mM EGTA. Se dejaron secar los filtros y se hizo la lectura en un contador de centelleo. Como control se usó un filtro al que se le habían aplicado directamente 10 µl de mezcla de reacción con ^{45}Ca , equivalente a 1 nanomola de CaCl₂, sin proteína ni ATP en base al cual se calcularon los valores de los resultados por mg de proteína.

9. Determinación de la actividad de ATPasa

La actividad de ATPasa se midió por colorimetría a través de la liberación de cantidades nanomolares de fosfatos inorgánicos equivalentes al ATP hidrolizado,. Esta determinación se basa en la reacción entre el fosfato inorgánico (P_i) y el verde de

malaquita. Para ello se incubaron alícuotas con 0.004 mg/ml de proteína en una solución que contiene (mM): 20 Tris-Malato (pH 7.0), 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 CaCl₂ (para la actividad total) o 1 EGTA (para la actividad de Mg²⁺-ATPasa o basal), 5 NaN₃ y 0.33 ATP. Para parar la reacción se agregaron a diferentes tiempos hidrócloruro de verde de malaquita al 0.045% en molibdato de amonio al 4.2% con HCl 4N (reactivo de Lanzetta) y citrato de sodio a una concentración final del 2.5%. Después de 30min se midió la absorbancia a 660nm en el espectrofotómetro. Las cantidades de fosfato liberado se calcularon con base en una curva estándar de fosfatos. La actividad de la Ca²⁺-Mg²⁺-ATPasa se calculó como la diferencia entre la ATPasa total y la basal.

10. Determinación de la unión de alta afinidad de DHP

La unión específica de dihidropiridina se determinó con el método de filtración de [³H]PN200-110 y se calculó como la diferencia entre el valor total y el inespecífico en base a un estándar conocido. Las membranas de TT se incubaron durante 3 horas en la oscuridad a una concentración de 7.5 µg/ml de proteína en una solución que contiene (mM): 50 MOPS (pH 7.4), 5⁻⁷ [³H]PN200-110, y para la unión inespecífica se añadió 0.001 de nifedipina. Se filtraron las muestras en filtros de nitrocelulosa Millipore de 0.45µm, se lavaron con 25ml de agua desionizada helada, se dejaron secar los filtros y se hizo lectura en un contador de centelleo.

11. Normalización de los valores

Para calcular los valores normalizados de los experimentos de cinética se tomó como valor igual a 1 el promedio de los valores reales de los controles al final de la reacción, y con respecto a este valor se calcularon los demás valores normalizados.

12. Calorimetría diferencial de barrido (CDB)

Los experimentos de calorimetría, se llevaron a cabo en un Microcalorímetro VP-DSC de MicroCal conectado a una computadora que contiene un sistema automático de recolección de datos. Para los experimentos en el CDB se suspendieron las membranas aisladas en una solución amortiguadora a pH 7.0. La concentración de proteína usada fue de 1-2mg/ml. El barrido de temperatura se hizo a una velocidad constante de 1°C/min de 10 a 100°C. Inmediatamente después, se enfrió a 10 °C seguido por un nuevo barrido de temperatura de 1°C/min hasta los 100°C. El segundo barrido tuvo el propósito de revelar procesos reversibles. En todos los casos, la desnaturalización de las proteínas de membrana fue irreversible. Las curvas obtenidas por el CDB (temperatura vs capacidad de calor (C_p)) fueron analizadas asumiendo una desnaturalización irreversible como ha sido previamente descrito (83). Este procedimiento necesita que la desnaturalización sea considerada como una reacción de dos estados de la forma $N \xrightarrow{k} D$, en donde la constante de velocidad k depende de la temperatura siguiendo la ecuación de Arrhenius. Las curvas (endotermas) del exceso de capacidad de calor, fueron desconvolucionadas en componentes individuales. La temperatura de transición (T_m) es definida como la temperatura registrada a la mitad del área de la curva. Esta área corresponde al valor de la entalpía (ΔH).

$$\text{Ecuación de Arrhenius} \quad k = Ae^{-\Delta H/RgT}$$

La calorimetría es el único método directo para determinar los parámetros termodinámicos de una molécula y su patrón de desnaturalización. Los parámetros termodinámicos obtenidos de la desnaturalización de una molécula en condiciones experimentales determinadas son características específicas de la misma, características que la distinguen de otras moléculas y dependen de su peso molecular y su conformación.

En el siguiente esquema se desglosa toda la metodología utilizada en la realización de este proyecto (Figura 16).

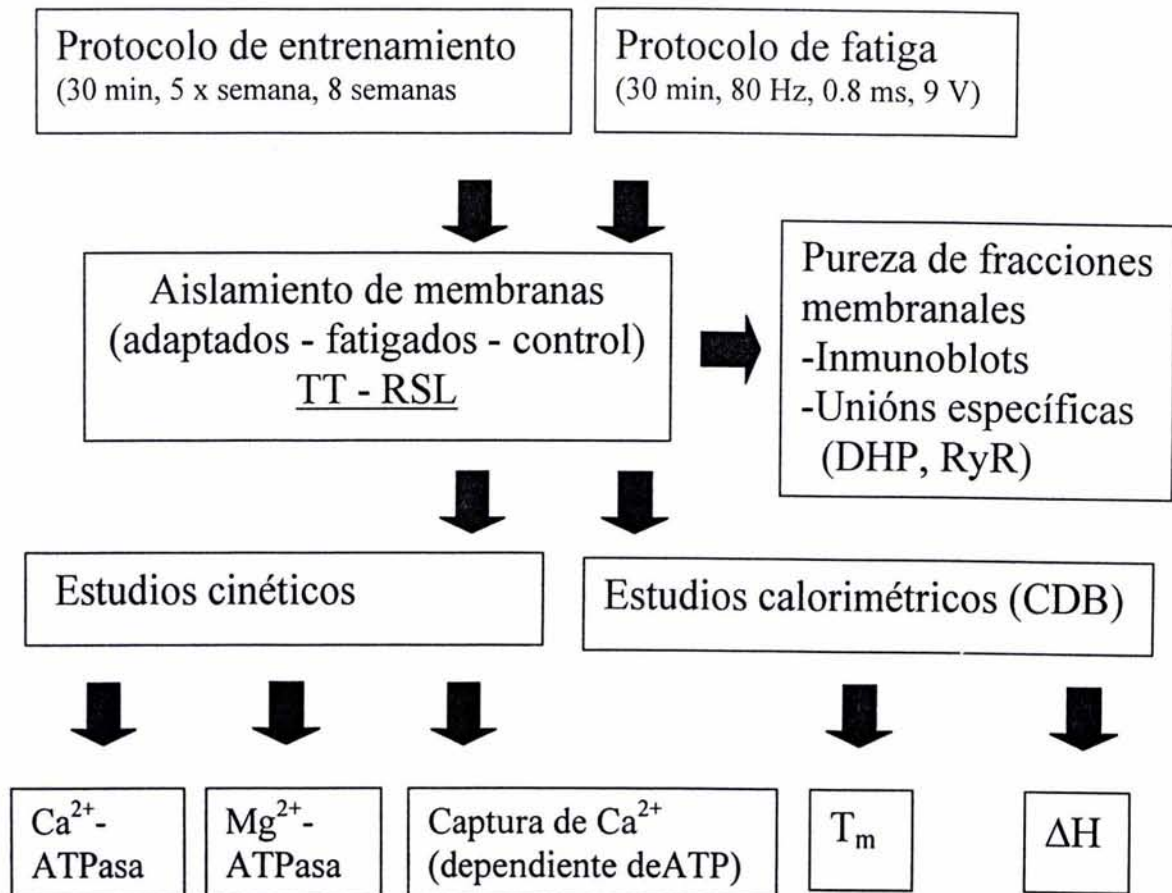


Figura 16. Resumen de los protocolos experimentales empleados

RESULTADOS

1. Pureza de las membranas

1.1 Inmunoelectrotransferencias

Para verificar que las fracciones de las membranas aisladas correspondían a muestras enriquecidas en TT y RS, respectivamente, se realizaron geles SDS-PAGE (Figura 17A) y un análisis de las proteínas marcadoras de TT, que es el RDHP, y de RS, que es la SERCA1, dónde se pudo apreciar la presencia de RDHP en el caso de las membranas de TT (Figura 17B), pero no en membranas de RS, y de SERCA1 en el caso de las membranas de RS, pero no de membranas de TT (Figura 17C), lo que demuestra la ausencia de contaminación de membranas de TT por RS y viceversa.

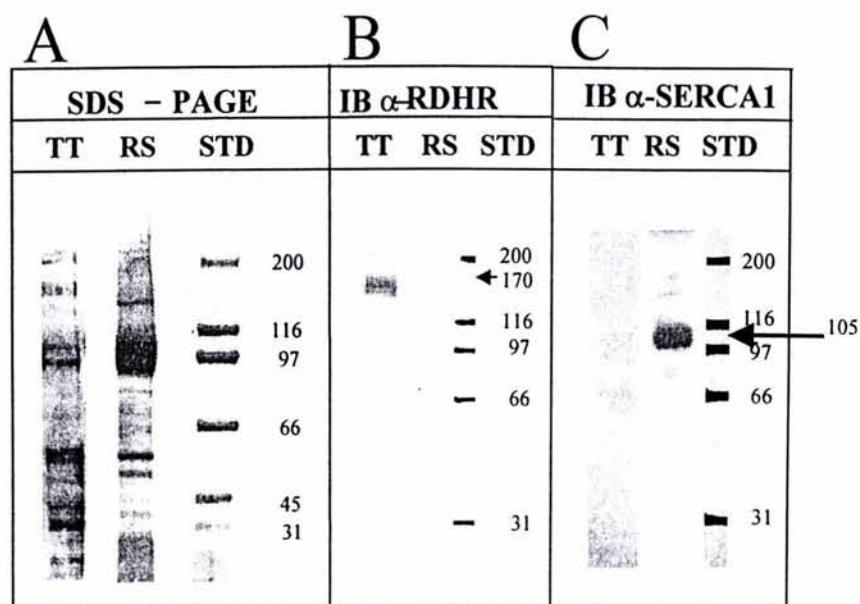


Figura 17. Análisis de Western Blot de TT y RS usando anticuerpos anti-receptor de DHP (α -RDHP) y anti-SERCA1 (α -SERCA1). De izquierda a derecha se observan: (A) Geles de SDS-PAGE de TT, RS y estándares moleculares con 5 μ g de proteína/carril y teñidos con plata (B, C) Transferencias de geles SDS-PAGE de TT, RS y estándares moleculares con 8 μ g de proteína/carril a membranas de nitrocelulosa, tratadas con anticuerpos α -RDHP y α -SERCA1, según se describe en *Materiales y Métodos*. (B) Inmunoblot (IB) α -RDHP, (C) IB α -SERCA1.

1.2 Unión específica de dihidropiridina y rianodina en TT

La pureza de las membranas de TT se determinó, además, a través de los inmunoblots descritos anteriormente, mediante la unión específica de DHP. Los valores obtenidos son de 9.3 y de 11.2 pmolas de unión específica de DHP/mg de proteína para músculos controles y adaptados al ejercicio, respectivamente. Por el otro lado no se detectó la unión específica de rianodina en ninguna de las fracciones membranales ligeras que correspondían a los TT, lo cual muestra, junto con la ausencia de respuesta para el anticuerpo contra SERCA1, que no hubo contaminación por vesículas de RS.

2. Adaptación

2.1 *Actividad de captura de Ca^{2+} dependiente de ATP.* La captura de Ca^{2+} dependiente de ATP en TT de músculos de conejos entrenados se vio afectada en forma significativa.

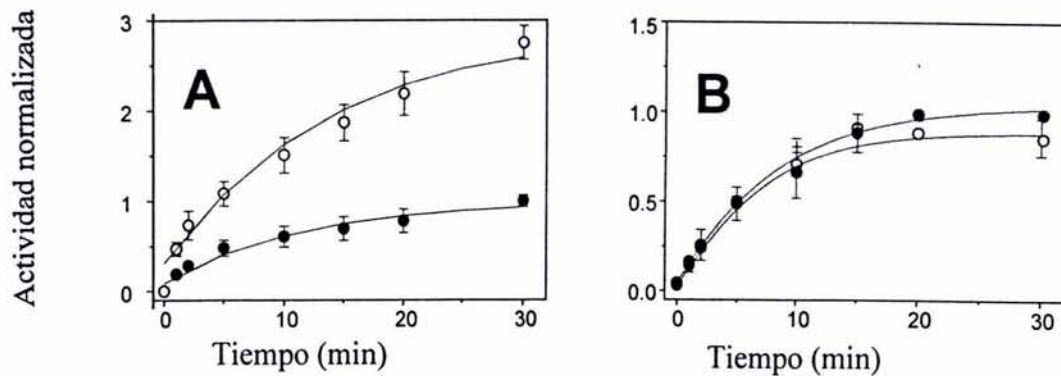


Figura 18. Efecto del entrenamiento sobre la captura de Ca^{2+} en TT (A) y RS (B). Los círculos cerrados corresponden al músculo control y los círculos abiertos al adaptado. La actividad de captura se presenta en forma normalizada, donde la captura de Ca^{2+} del control a los 30 minutos de iniciada la reacción corresponde al valor 1. En TT (A) los valores reales a los 30 min eran de 60.1 ± 2.3 (control) y 160.1 ± 11 (adaptado) nanomolas de Ca^{2+} /mg de proteína. En RS (B) los valores reales a los 30 min eran de 300 ± 2 (control) y 260 ± 3 (adaptado) nanomolas de Ca^{2+} /mg de proteína.

En la figura 18A se observa que a los 30 minutos la captura de Ca^{2+} se había incrementado 2.6 veces en los TT de músculos de conejos entrenados, de 60.10 ± 2.3 a 160.10 ± 11.0 nmolas de Ca^{2+} transportado / mg de proteína ($n=4$, $p<0.05$). Sin embargo, en el caso del

transporte de Ca^{2+} en membranas de RS obtenidas de músculos de conejos entrenados, no hubo cambios significativos en comparación con los controles, como muestra la figura 18B. Las capturas fueron de 260 ± 3 y de 300 ± 2 nmolas de Ca^{2+} transportado / mg de proteína ($n=4$, $p < 0.05$), respectivamente.

2.2 Actividad hidrolítica de ATPasa. La actividad hidrolítica de ATPasa de Ca^{2+} a los 30 minutos de iniciada la reacción se incrementó 1.8 veces con respecto al control en las vesículas de TT obtenidas de músculos de conejos entrenados, de 7.0 ± 0.27 a 13.0 ± 2.8 μmol de Pi / mg de proteína ($n=4$, $p < 0.005$) (Figura 19A). La actividad de ATPasa de Mg^{2+} , que corresponde a la proteína y actividad hidrolítica de ATPasa más abundantes en membranas de TT, se incrementó 3.6 veces en animales entrenados, de 2.9 ± 0.4 a 10.5 ± 1.4 μmol de Pi / mg de proteína ($n=4$, $p < 0.005$) (Figura 19B).

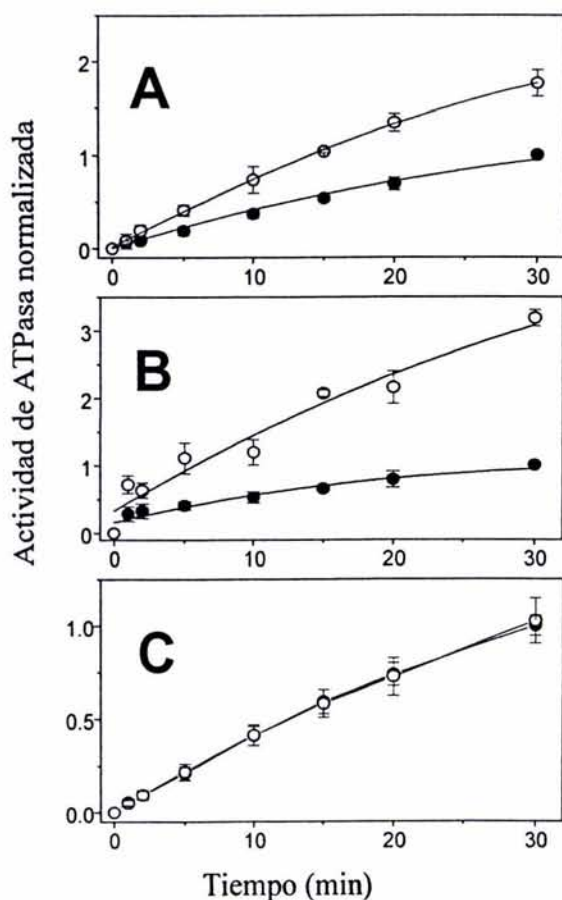


Figura 19. Efecto del entrenamiento sobre las actividades hidrolíticas de ATPasa. Los círculos cerrados corresponden al músculo control y los círculos abiertos al adaptado. La actividad de hidrólisis de ATP se presenta en forma normalizada, dónde el valor 1 corresponde al control a los 30 minutos de iniciada la reacción. (A) ATPasa de Ca^{2+} de TT, control: $7.0 \pm 0.27 \mu\text{mol}$; adaptado: $13.0 \pm 2.8 \mu\text{mol}$ (B) ATPasa de Mg^{2+} de TT, control: $2.9 \pm 0.4 \mu\text{mol}$; adaptado: $10.5 \pm 1.4 \mu\text{mol}$ (C) ATPasa de Ca^{2+} de RS, control: $13.5 \pm 0.8 \mu\text{mol}$; adaptado: $14.2 \pm 3.0 \mu\text{mol}$.

No se observaron cambios significativos en la actividad hidrolítica de la ATPasa de Ca^{2+} en RS como consecuencia de la adaptación al ejercicio (Figura 19C); las actividades fueron de 13.5 ± 0.8 μmol de Pi / mg de proteína y de 14.2 ± 3 μmol de Pi / mg de proteína para vesículas de animales controles y entrenados, respectivamente ($n=4$, $p < 0.005$).

2.3 Calorimetría diferencial de barrido. Para investigar si los cambios observados en la actividad de las ATPasas de los TT y el RS observados después del protocolo de entrenamiento correspondía a cambios conformacionales en las proteínas de membrana estudiamos mediante CDB el perfil de desnaturalización de las proteínas de estas membranas.

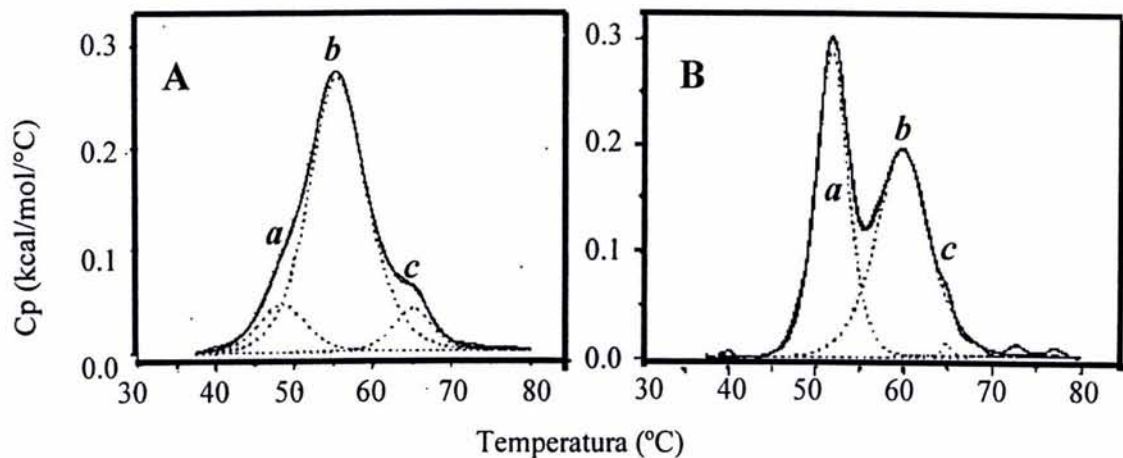


Figura 20. Perfiles de Calorimetría Diferencial de Barrido de membranas de TT control (A) y adaptado (B). La línea sólida representa los datos experimentales y la línea punteada al mejor ajuste teórico. Las transiciones corresponden a (a) la ATPasa de Ca^{2+} , (b) la ATPasa de Mg^{2+} y (c) el RDHP.

La desnaturalización fue irreversible después de alcanzar una temperatura de 100°C .

Tanto las membranas aisladas de TT como de RS mostraron cambios importantes en su perfil de desnaturalización como resultado del protocolo de entrenamiento. La temperatura de transición y la entalpía (calor de transición) de las bombas de Ca^{2+} indican que sus estructuras nativas habían cambiado después del entrenamiento. Los perfiles de

desnaturalización térmica que se ven en la figura 20 corresponden a membranas de TT obtenidas de conejos controles (A) y adaptados al ejercicio (B), y presentan principalmente tres transiciones. Estas transiciones son las mismas que las que fueron descritas previamente por Ortega y Lepock (103), quienes atribuyen la transición *a* a la desnaturalización de la bomba de Ca^{2+} y relacionan la transición *b* con la actividad de la Mg^{2+} -ATPasa. La transición *c* corresponde a la desnaturalización del RDHP (datos no publicados de A. Ortega). Como se observa en la figura 20B, las tres transiciones (*a*, *b*, y *c*) muestran cambios importantes en T_m y entalpía. Sin embargo, los cambios más importantes con respecto a la T_m se observan en las transiciones *a* y *b*. Una desviación de 3°C en la T_m de la transición *a*, de 49 ± 0.4 a 52 ± 0.1 $^\circ\text{C}$ ($n=3$) y un incremento de 2.5 veces en la entalpía, de 367 ± 45 ($n=3$) a 919 ± 102 kJ/mol ($n=3$) indican que un importante cambio conformacional ocurrió en la bomba de Ca^{2+} de TT. La transición *b* muestra una desviación de 4°C en su T_m , de 56 ± 1 a 60 ± 1 $^\circ\text{C}$ ($n=3$); sin embargo, la entalpía disminuyó en un 60%, de 2570 ± 112 ($n=3$) a 1030 ± 98 kJ/mol ($n=3$) en membranas obtenidas de conejos adaptados al ejercicio. La T_m asociada al componente *c* no cambió significativamente, de 65.06°C a 64.8°C , pero la entalpía disminuyó en un 50%, de 1410 a 731 kJ/mol en membranas de músculos entrenados.

Las membranas de RS ligero en ausencia de CaCl_2 muestran un perfil de desnaturalización con principalmente una transición; ésta corresponde a la desnaturalización de la bomba de Ca^{2+} (SERCA). En presencia de 1 mM CaCl_2 aparecen dos diferentes transiciones, como ha sido reportado por Lepock et al (80) (Figura 21A y B). Estas corresponden a la desnaturalización del dominio citoplasmático de fijación de nucleótidos (*a*) y al dominio transmembranal de unión de Ca^{2+} (*b*) de SERCA. La figura 21 A muestra el perfil de CDB de membranas de RS aisladas de músculo de conejos control y

la figura 21 B de adaptados al ejercicio. Los estudios de CDB revelaron cambios en los parámetros termodinámicos de la SERCA como consecuencia de la adaptación al ejercicio. En la transición *a*, la adaptación al ejercicio no produjo cambios significativos. La T_m bajó de 51.89°C a 51.07°C, y la entalpía se elevó de 866 a 896 kJ/mol. Los cambios producidos en la transición *b* fueron más importantes. Se produjo una desestabilización térmica, ya que la T_m bajó de 63.02 a 58.7°C±0.2 °C y la entalpía bajó de 409 a 148 kJ/mol.

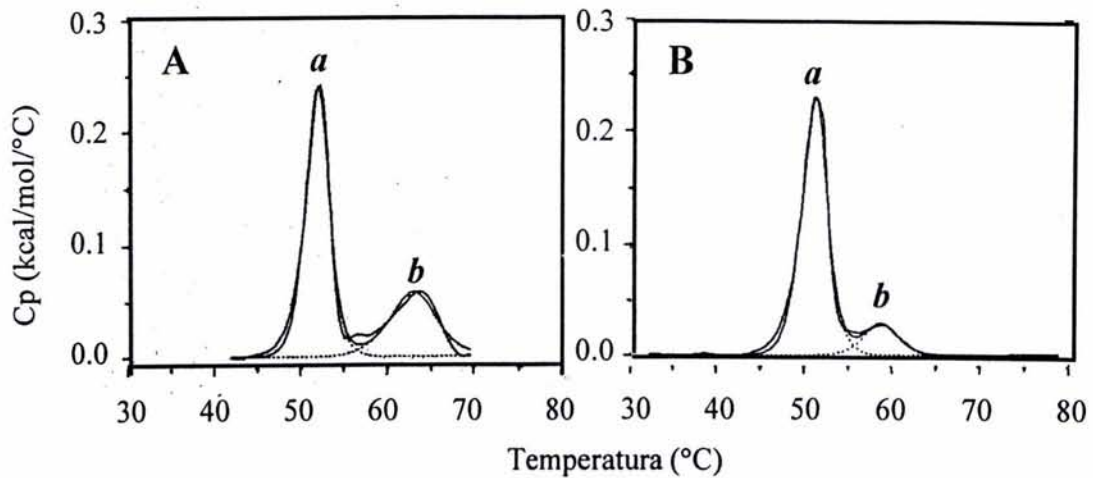


Figura 21. Perfiles de Calorimetría Diferencial de Barrido de membranas de RS control (A) y adaptado (B). El experimento se realizó en presencia de 1 mM de CaCl_2 . La línea sólida representa los datos experimentales y la línea punteada al mejor ajuste teórico. Las transiciones corresponden a (*a*) el dominio fijador de nucleótidos de SERCA y (*b*) al dominio fijador de Ca^{2+} de SERCA.

3. Fatiga Muscular

3.1 Registros de Fatiga Muscular. Las preparaciones usadas para estos estudios provinieron de músculos adecuadamente fatigados. Esto se comprobó al obtener con el mismo protocolo de estimulación los registros de las contracciones en otros conejos controles, antes de elaborar las preparaciones utilizadas para los experimentos bioquímicos y calorimétricos (Figura 22). Se observó que en tres series de estimulaciones de los músculos intercaladas por lapsos de recuperación sin estimular, se pudo lograr una pérdida

de la fuerza de contracción. Después de la primera serie de estimuciones de 3 a 4 minutos de duración, la fuerza de contracción había disminuido a un 40% de la fuerza inicial (Figura 22A). Después del primer período de descanso, la recuperación de la fuerza fue incompleta. Sólo se alcanzó entre un 45 y 50% de la fuerza inicial. Eso significa que una parte de la fuerza de contracción se perdió de manera irreversible, o era de una recuperación más lenta de lo que permitimos observar en los experimentos. En las siguientes series de estimuciones la disminución de la fuerza era mucho más rápida (Figura 22B). A los 30 a 60 segundos de iniciar, la fuerza bajó al 25% de la fuerza inicial del ciclo correspondiente. Sin embargo, la recuperación ahora llegaba a alcanzar cerca del 100% del ciclo anterior. Este fenómeno de fatiga rápida y de recuperación casi completa a corto plazo se pudo lograr en varias repeticiones.

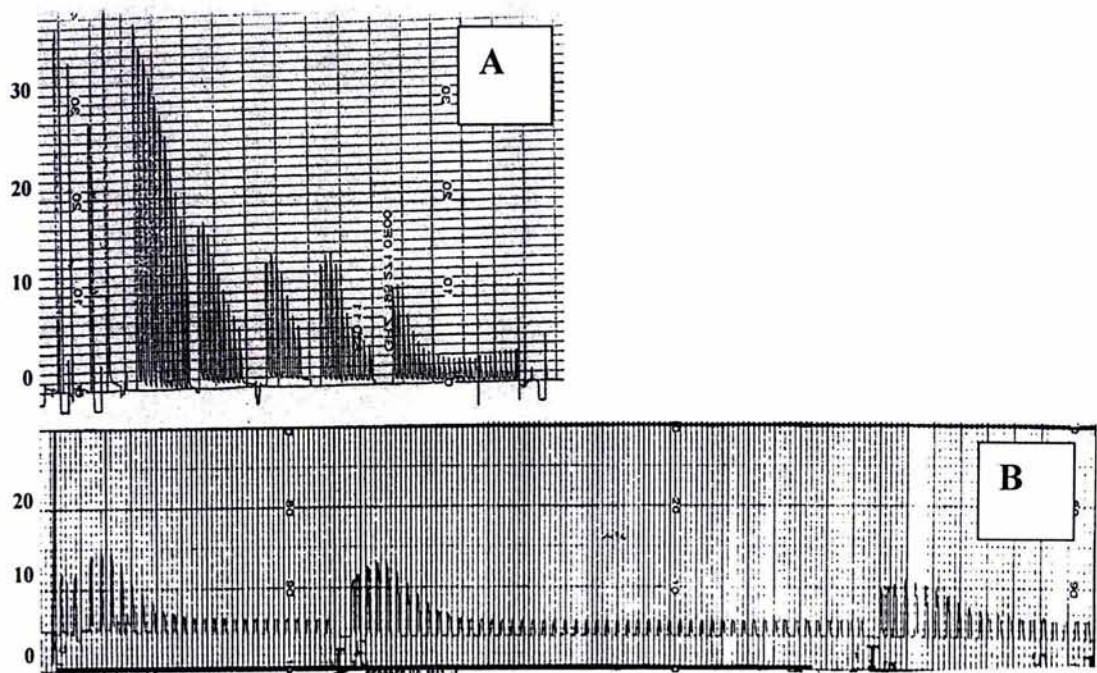


Figura 22. Registros de contracciones musculares por estimulación tetánica. Fatigas y recuperaciones múltiples

3.2 *Actividad de Captura de Ca^{2+}* . En TT, la fatiga por estimulación eléctrica resultó en una disminución de la captura de Ca^{2+} dependiente de ATP, de 54.3 ± 4.3 a 46.4 ± 1.7 nanomolas de $^{45}CaCl_2$ por mg de proteína a los 30 minutos de haber iniciado el experimento ($n=4$, $p<0.05$) (Figura 23-TT). En RS, la fatiga por estimulación eléctrica resultó en una disminución de la captura de Ca^{2+} dependiente de ATP y estimulada por oxalato, de 810 ± 66 a 686 ± 58 nanomolas de $^{45}CaCl_2$ por mg de proteína a los 30 minutos de haber iniciado el experimento ($n=4$, $p<0.05$) (Figura 23-RS).

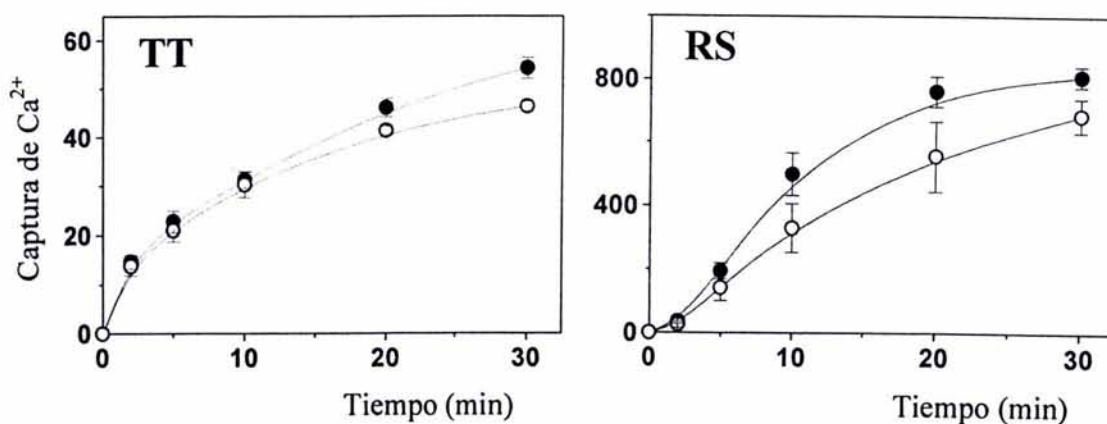


Figura 23. Efecto de la fatiga sobre la captura de Ca^{2+} en (TT) túbulos transversos y (RS) retículo sarcoplásmico. Los círculos cerrados corresponden al músculo control y los círculos abierto al fatigado. La actividad de captura se presenta en nanomolas de Ca^{2+} transportado / mg de proteína. Los experimentos en RS se realizaron en presencia de 5 mM de oxalato de potasio.

3.3 *Actividad hidrolítica de ATPasa*. La fatiga por estimulación eléctrica no produjo cambios significativos en la actividad de Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa de TT a los 30 minutos, con 5.35 ± 1.69 μ molas de Pi por mg de proteína en el control y 5.60 ± 0.92 μ molas de Pi por mg de proteína en el fatigado ($n=4$, $p<0.05$) (Figura 24-TT). Asimismo, tampoco se observaron cambios significativos en la actividad de Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa de RS a los 30 minutos, con 14.71 ± 1.53 μ molas de Pi por mg de proteína en el control y 15.68 ± 1.88 μ molas de Pi por mg de proteína en el fatigado ($n=4$, $p<0.05$) (Figura 24-RS).

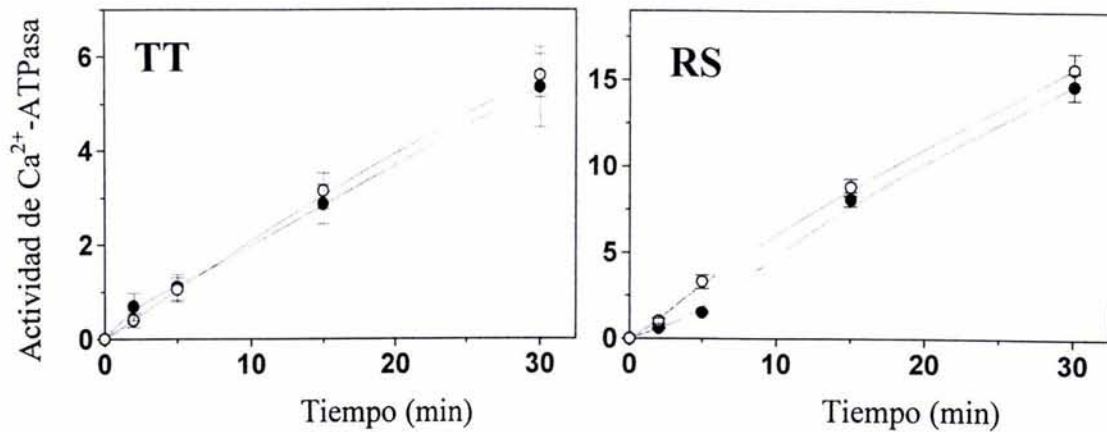


Figura 24. Efecto de la fatiga sobre la actividad de hidrólisis de ATP en (TT) túbulos transversos y (RS) retículo sarcoplásmico. Los círculos cerrados corresponden al control y los círculos abiertos al fatigado. La actividad de hidrólisis se presenta en micromolas de Pi liberado / mg de proteína.

3.4 *Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) de TT.* Los estudios de CDB revelaron cambios en los parámetros termodinámicos de los tres componentes de los TT como consecuencia de la fatiga por estimulación tetánica (Figura 25). En la transición *a*, la T_m se elevó de $48.53 \pm 0.2^\circ\text{C}$ a $50.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ($n=3$). En la transición *b*, la T_m no cambió

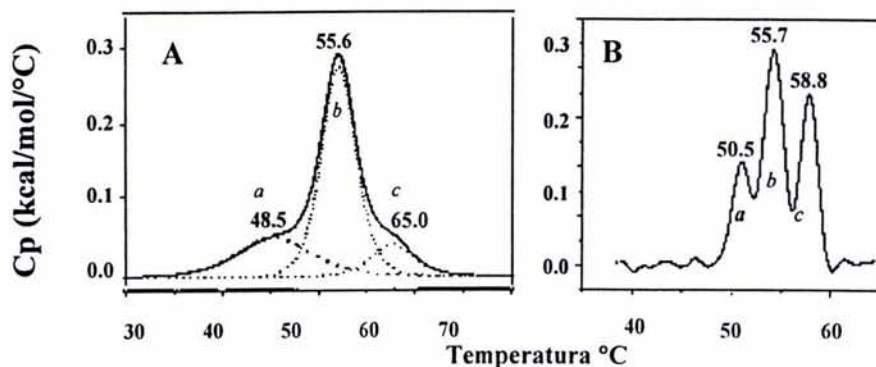


Figura 25. Calorimetría diferencial de barrido de membranas de TT control (A) y fatigado (B)

significativamente, pero la entalpía disminuyó. En la transición *c*, la T_m bajó de $65.06^\circ\text{C}\pm 0.13$ a $58.80\pm 0.33^\circ\text{C}$ y la entalpía aumentó. Ya que existe la posibilidad que la fatiga muscular está acompañada por una elevación en la concentración intracelular de Ca^{2+} , se realizó la desnaturalización térmica de las proteínas de las membranas de TT control y fatigadas mediante CDB en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} (10mM) (Figura 26). El perfil de desnaturalización de las membranas de TT no fatigadas no mostró diferencias debido a una alta concentración de Ca^{2+} (resultado no mostrado). Sin embargo, el perfil de desnaturalización de TT fatigados se asemejó al de los TT adaptados al ejercicio, con las T_m de 53°C , 62°C y 65°C , y la relación entre las entalpías de las tres

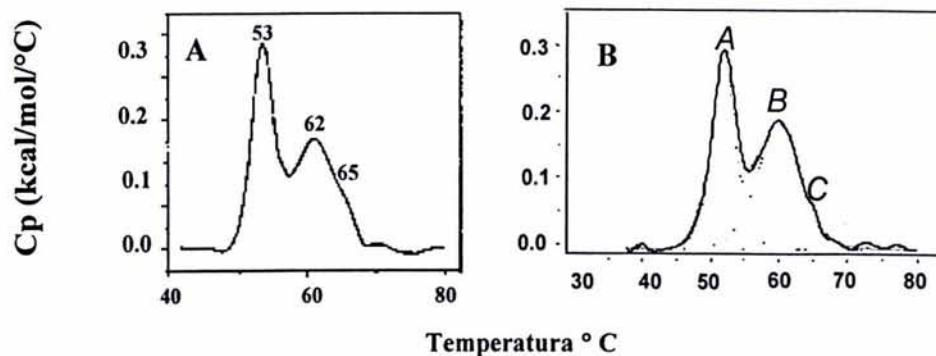


Figura 26. Calorimetría diferencial de barrido de membranas de TT aislados de músculo fatigado, en presencia de 10mM CaCl_2 (A) y de músculo adaptado (B).

transiciones similar a los TT de adaptados (Figura 26). Esto sugiere que las conformaciones de las tres principales proteínas de TT producidas con la adaptación del músculo al ejercicio, está relacionada con la unión de Ca^{2+} a estas proteínas.

3.5 *Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) de RS.* Como resultado de la fatiga por estimulación tetánica se produjo una desestabilización térmica en ambos dominios de la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa de RS (Figura 27). En el dominio citoplasmático la T_m bajó de 51.89°C

a 50.7°C y en el dominio transmembranal de 63.02°C a 59.4°C. La entalpía del dominio transmembranal aumentó. Estos resultados muestran principalmente cambios en los parámetros termodinámicos del dominio de unión de Ca^{2+} debido a la fatiga, con pocos cambios en el dominio de unión de nucleótidos. Estos cambios termodinámicos pueden ser el indicador que ocurrieron cambios conformacionales en este dominio que pueden ser las responsables de la disminución en la actividad de captura de Ca^{2+} pero no de la actividad de

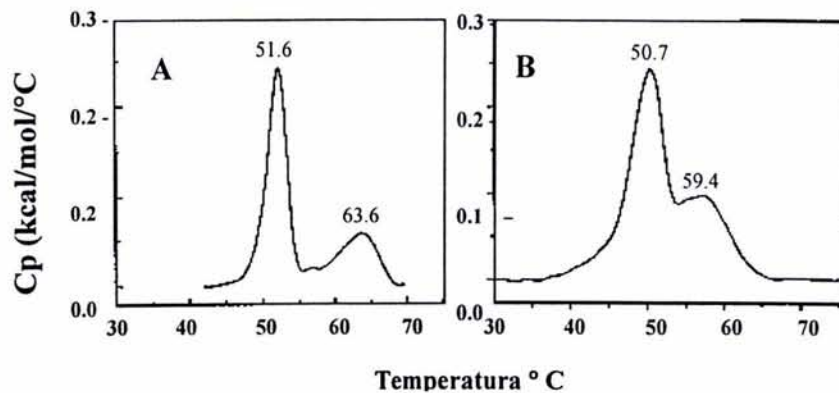


Figura 27. CDB de membranas de RS en presencia de 1 mM CaCl_2 , aisladas de músculo control (A) y músculo fatigado (B)

hidrólisis por la Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPasa de RS durante condiciones de actividad elevada.

DISCUSION

1) Adaptación del músculo esquelético al ejercicio

El presente trabajo demuestra que uno de los mecanismos de adaptación al ejercicio de resistencia es la activación de la bomba de Ca^{2+} de TT, con un aumento en el transporte de Ca^{2+} a la luz de los TT (espacio extracelular) en contra del gradiente de concentración en el reposo. Mientras tanto, el transporte de Ca^{2+} del citoplasma al lumen del RS no se ve afectado. La bomba de Ca^{2+} de RS (SERCA1) del músculo adaptado al ejercicio en reposo

trabaja igual que la del músculo sin previo entrenamiento. El hecho de que la actividad de SERCA1 no se vea aumentada después de un protocolo de entrenamiento, significa que el RS no puede almacenar más Ca^{2+} , considerando que su capacidad de almacenaje es limitada.

La contribución de la bomba de Ca^{2+} de los TT en la actividad de músculos entrenados

Este es el primer estudio que muestra los efectos de un programa de entrenamiento con una duración de 8 semanas sobre la actividad de hidrólisis y de transporte de Ca^{2+} por parte de la PMCA de TT, además de dar evidencias sobre cambios en su conformación observados a través de los cambios en los parámetros termodinámicos durante la desnaturalización térmica de las proteínas de los TT aislados de músculos adaptados.

En el músculo entrenado en estado de reposo, la bomba de Ca^{2+} de los TT (PMCA) es capaz de transportar 2.5 veces más Ca^{2+} del interior al exterior de la célula que el músculo control. A diferencia del músculo control, el músculo adaptado desarrolló su capacidad para hidrolizar ATP y transportar Ca^{2+} posiblemente como respuesta a un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que puede ocurrir durante una actividad muscular prolongada. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta, el proceso de relajación muscular se inhibe resultando en una contracción muscular más lenta, además de que la apertura de los RyR también se inhibe, resultando en una disminución en la fuerza de contracción (fatiga).

El aumento en la actividad de la bomba de Ca^{2+} de los TT de músculos entrenados, al mismo tiempo de reducir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, podría resultar en una elevación local de la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la luz de los TT, eso es, en el exterior de la célula. En relación al efecto de las $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sobre el AEC o la fuerza de contracción existen varios reportes en la literatura. En ese sentido,

Cairns observó que altas $[Ca^{2+}]_e$ restauraron la fuerza de contracción en músculo esquelético rápido estimulado con pulsos de 200 Hz durante 0.1 ms, cuando la fuerza de contracción había sido inhibida con 10 mM de K^+ (21). Mientras tanto, la eliminación del Ca^{2+} extracelular acentuó la incapacidad del músculo esquelético para mantener la máxima tensión tetánica (109,117). Previamente, ya se había visto, que la disminución de la $[Ca^{2+}]_e$ estaba relacionado con una disminución en el movimiento de cargas en el RDHP en fibras únicas de músculo esquelético (17) y con una disminución en la liberación de Ca^{2+} por el RyR (16).

Durante una estimulación prolongada se podría despolarizar el potencial de membrana y el sensor de voltaje del RDHP se volvería insensible al potencial de acción entrante. La recuperación de la actividad del sensor de voltaje podría suceder como consecuencia de a) la repolarización de la membrana por una elevada $[Ca^{2+}]$ en el lumen de los TT, b) la unión de Ca^{2+} a un sitio extracelular de baja afinidad del RDHP. De esta manera se llevaría a cabo el movimiento de cargas en el RDHP necesario para el AEC y la liberación de Ca^{2+} por los RyR retrasando el efecto deletéreo de la estimulación continua sobre el ciclo de relajación-contracción, y la presentación de la fatiga muscular.

Los cambios en los parámetros termodinámicos del perfil de desnaturalización de los TT obtenidos de músculos adaptados (similares a los de TT obtenidos de músculos fatigados e incubados en presencia de 10 mM de $CaCl_2$; resultados que se discutirán más adelante) indican que hubo cambios conformacionales en las tres principales transiciones de los TT. Eso pudiera indicar que las tres proteínas más abundantes en estas membranas adquieren una conformación estable, diferente a la del control, probablemente gracias a la unión estable de moléculas de Ca^{2+} a sitios específicos. La unión de Ca^{2+} a las proteínas en

las preparaciones de músculo adaptado podría ser inducida tanto por un aumento en las $[Ca^{2+}]$ como por un aumento en la afinidad de los sitios de Ca^{2+} , o ambos, y les permitiría responder con un adecuado transporte de Ca^{2+} para realizar una actividad contráctil repetitiva.

Los cambios conformacionales observados por calorimetría en las bombas de Ca^{2+} de los TT (transición *a*) se correlacionan con un aumento en la actividad de esta proteína, que muestra un aumento del transporte de Ca^{2+} a la luz de los TT.

Los cambios en la estabilidad térmica de la Ca^{2+}/Mg^{2+} -ATPasa de los TT (transición *b*) están asociados a un aumento en la actividad de esta enzima de la cual se desconoce su función, por lo que no podemos por el momento saber, cuál sería la razón de ser estimulada por el entrenamiento. Podemos concluir que tiene una gran importancia en el funcionamiento muscular y que participa probablemente como mecanismo de protección en contra de la presentación temprana de la fatiga. Esta enzima podría ser la responsable del transporte de algún otro elemento que afecte el funcionamiento de la fibra muscular hacia el exterior de la misma.

Los cambios conformacionales observados en los RDHP (transición *c*) podrían producirse gracias a la elevación en la actividad de las bombas de Ca^{2+} de los TT durante el entrenamiento ya que eso pudiera permitir la unión de Ca^{2+} a un sitio extracelular del sensor de voltaje. Esta unión de Ca^{2+} se podría producir a través de un aumento en la afinidad del receptor por el Ca^{2+} , o a una mayor $[Ca^{2+}]_e$ localizada en un sitio cercano a la ubicación de receptores.

Por lo mencionado anteriormente, proponemos que el músculo requiere en condiciones de actividad prolongada el suministro de Ca^{2+} a la luz de los TT, en donde se

encuentra en contacto con el sitio externo de los RDHP, lo cual en el caso del músculo adaptado se logra gracias a la actividad potenciada de las bombas de Ca^{2+} de los TT.

¿Porqué el transporte de Ca^{2+} de los TT obtenidos de músculos adaptados al ejercicio se encuentra aumentado 2.5 veces en el reposo comparado con el control?

Las actividades mencionadas en el trabajo son por mg de proteína total. Cambios en las actividades por mg de proteína pueden deberse a cambios en la actividad específica, o a un cambio en el porcentaje que la enzima representa de la proteína total. En el caso de SERCA no es posible un aumento en el porcentaje de la proteína total, ya que en el músculo control ocupa el 95%, pero sí existe la posibilidad de que disminuya en proporción. En el caso de una disminución de la proporción de la enzima, la disminución en la actividad “específica” puede ser aparente. En el caso de la Mg^{2+} -ATPasa de TT el caso es similar, ya que se dice que ocupa el 80% de las proteínas de los TT. En el caso de la Ca^{2+} -ATPasa de TT el aumento en la actividad específica sí puede deberse a un aumento en su proporción con respecto a la proteína total debido a que ocupa una fracción pequeña de la proteína total. En el caso de un aumento neto de la actividad específica de la bomba de Ca^{2+} de TT la explicación podría ser que esta enzima, tanto como el RDHP, adquieren una conformación estable más eficiente y están preparados para el momento en que se requiera de un mayor rendimiento (como en un estado de “preactivación”), considerando que aún en el músculo en reposo hay una mayor actividad en el transporte de Ca^{2+} al exterior. Esta conformación diferente podría o no estar relacionada con un cambio en la isoforma, sin embargo, en este trabajo no hicimos los estudios correspondientes.

La contribución de la SERCA1 en la actividad de los músculos entrenados

En nuestros estudios no existen diferencias entre la actividad de la SERCA1 obtenida de músculos entrenados y no entrenados, cuando las membranas son aisladas

después de un periodo de reposo. La modificación de la estabilidad térmica de la SERCA1, principalmente de la transición b asociada al sitio de unión de Ca^{2+} , de músculos obtenidos de conejos entrenados, indica un cambio conformacional que involucra principalmente al dominio transmembranal (Figura 21). Este cambio conformacional puede o no estar asociado a cambios en la actividad de la enzima. Previamente se ha observado (106), que la pérdida de estabilidad en el dominio transmembranal está asociado a la pérdida de actividad de SERCA1.

Se ha reportado que ocurre una disminución en la actividad de la SERCA1 en músculos no entrenados cuando realizan ejercicio (10, 20, 38, 150). Como consecuencia de la disminución en la actividad del RS se produce un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. También existen reportes que indican que no hay diferencias entre la actividad de la SERCA1 de tejido entrenado y no entrenado en reposo; sin embargo, la actividad de la SERCA1 de músculos recién ejercitados no entrenados está inhibida en comparación con entrenados (48). En este contexto, nuestros resultados muestran que el músculo entrenado ha desarrollado mecanismos que le permiten disminuir las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y mantener la homeostasis.

El hecho de no encontrar diferencias importantes en la captura de Ca^{2+} y la actividad hidrolítica de la SERCA1 significa que el cambio conformacional de la enzima observado por calorimetría corresponde a una conformación de la enzima completamente activa. Es probable que en alguna otra situación este cambio conformacional pudiera expresarse en una protección contra la pérdida de actividad de SERCA1. De esta manera, el entrenamiento favorecería la resistencia de la fibra muscular a la pérdida en su capacidad para mantener la tensión más que a una elevación en la misma, como resultado de la actividad prolongada.

Descartar la posible contribución del Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Durante la despolarización continua en una actividad muscular prolongada se producen potenciales de acción repetidos, lo cual aumenta la concentración intracelular del Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$) y disminuye la concentración extracelular del Na^+ ($[\text{Na}^+]_e$), es decir, en el lumen de los TT (11). El aumento de la $[\text{Na}^+]_i$ despolariza el potencial de membrana y disminuye el gradiente de concentración ($\Delta\mu_{\text{Na}}$) a través de la membrana plasmática de los TT. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ contribuye a restablecer las $[\text{Na}^+]_i$ y funciona en contra del $\Delta\mu_{\text{Na}}$. Durante la estimulación prolongada existe una mayor entrada de Na^+ a la célula, por lo que la remoción de Na^+ por el intercambiador llevaría asociada la incorporación de Ca^{2+} al citoplasma en lugar de transportar Ca^{2+} al exterior de la célula, elevando así más la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ también es capaz de remover Ca^{2+} del citoplasma a cambio de introducir Na^+ al interior de la célula. En el caso del músculo estimulado durante un tiempo prolongado, hay un aumento en la concentración intracelular tanto de Na^+ como de Ca^{2+} , y la remoción de cualquiera de los dos llevaría consigo la elevación del otro.

2) Fatiga del músculo esquelético por estimulación eléctrica

La estimulación tetánica de los músculos rápidos con pulsos eléctricos resulta en una caída de la fuerza de contracción. En estas condiciones las bombas de Ca^{2+} del RS y de los TT muestran los siguientes resultados: 1) la actividad hidrolítica de la SERCA1 y la bomba de Ca^{2+} de los TT no se encuentra modificada, 2) la captura de Ca^{2+} por el RS y los TT está disminuida en un 15 y 33 %, respectivamente, 3) el patrón de desnaturalización del RS aislado de músculos fatigados muestra una pérdida en la estabilidad del dominio de unión de Ca^{2+} de la SERCA1, 4) el patrón de desnaturalización de las membranas de TT

muestra un aumento en la T_m de la transición que corresponde a la desnaturalización de la bomba de Ca^{2+} y un aumento en la entalpía de la transición que corresponde a la desnaturalización de los RDHP con una disminución en la T_m , 5) el patrón de desnaturalización de las membranas de TT calentadas en presencia de 10mM de CaCl_2 muestra semejanza con el de las membranas de TT obtenidas de músculos adaptados.

Registros de la fuerza de contracción durante la fatiga.

Las preparaciones de membranas usadas para los experimentos provienen de músculos fatigados, ya que en varias series de estimulaciones se produjo una disminución de la fuerza de contracción de manera reversible, aunque la recuperación de la fuerza durante el primer período de descanso fue incompleta. Eso pudiera significar que hubo una pérdida de la fuerza de contracción inicial que requiere un tiempo de recuperación mayor del que se permitió en el experimento, o que existe ya un daño irreversible en la fibra. Lännergren y Westerblad han observado dos fases durante la fatiga: primero se presenta una caída rápida de la fuerza de contracción, seguida por una fase lenta (80). Después ocurre una inhibición de la liberación de Ca^{2+} por el RS (27, 36), y más tarde se presenta la inhibición de la captura de Ca^{2+} por SERCA1. Durante la recuperación se han descrito dos fases (37, 80); una fase rápida que se presenta a los dos minutos, seguida por una fase lenta, que dura entre 1 hora o hasta días (71).

En la cadena de eventos que surgen durante la estimulación en las células musculares, están los movimientos de Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. Durante los potenciales de acción repetitivos, la membrana es despolarizada temporalmente de -80 a -60 mV (8, 74, 80), causando una reducción en el movimiento de cargas en TT inversamente relacionado con la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ (17). La bomba de Na^+/K^+ restablece rápidamente

el desequilibrio electrolítico, lo que podría explicar la fase rápida de la recuperación (37). La fase lenta de recuperación (fatiga de baja frecuencia) ha sido relacionada con el reajuste del pH, la concentración intracelular de fosfatos (8), y la “desinhibición” de los RyR (146). Es importante valorar que nuestras preparaciones fueron colectadas en la fase lenta de la recuperación, lo cual sugiere que los cambios observados podrían estar relacionados con alteraciones en la homeostasis de la $[Ca^{2+}]_i$.

Efecto de las estimulaciones tetánicas (fatiga) sobre la función y estructura de la SERCA1.

Una disminución en la actividad de captura (10, 20, 38, 150) y/o hidrolítica (20, 38) de la SERCA1 de músculo fatigado, asociada a una disminución en la liberación de Ca^{2+} a través de los RyR (27, 36), han sido observadas previamente (48, 150).

Como resultado de las contracciones continuas se inhibe el transporte de Ca^{2+} hacia la luz del RS y aumenta la salida de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} del RS y la entrada de Ca^{2+} al citoplasma a través de los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje de los TT. Esto ocasiona un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y, en consecuencia, del tiempo de relajación. Aunque la captura de Ca^{2+} está ligeramente inhibida y el perfil de desnaturalización de la SERCA1 muestra un cambio conformacional en el dominio de unión de Ca^{2+} , representado por una pérdida en la estabilidad térmica, la actividad hidrolítica de SERCA1 no presenta cambios. Este desacoplamiento entre las dos actividades podría tener dos significados: 1) Aunque haya una adecuada unión de Ca^{2+} al sitio de alta afinidad e hidrólisis de ATP, el Ca^{2+} no es transportado al interior de RS, probablemente por una alteración en el sitio de unión de Ca^{2+} de baja afinidad por la acción de ERO (ON) sobre grupos SH de la SERCA1; 2) Las vesículas de membranas de RS fatigado podrían ser más permeables como resultado de

alguna alteración en su composición lipídica y/o proteica, debido a la peroxidación de los lípidos por estrés oxidativo que ocurre durante la actividad contráctil prolongada. Esta situación permitiría el escape de Ca^{2+} por difusión pasiva, simulando una inhibición en la captura de Ca^{2+} asociada a una relativa normalidad en la actividad de hidrólisis. Estas mismas alteraciones en la arquitectura lipídica de la membrana pueden ser la razón de los cambios en la conformación de las proteínas intrínsecas.

Efecto de las estimulaciones tetánicas (fatiga) sobre la función de la bomba de Ca^{2+} de los TT.

La disminución de la captura de Ca^{2+} por las membranas de TT obtenidas de músculos fatigados no está asociada a cambios en la actividad hidrolítica. Como se mencionó en la sección de adaptación, existen evidencias que sugieren que cuando la membrana plasmática está despolarizada durante una estimulación prolongada, el RDHP es activado por una $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{TT}}$ más elevada, y que esta activación es necesaria para producir el AEC por movimientos de cargas (16, 17) y para mantener la fuerza de contracción (21, 117). Una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{TT}}$ local pudiera estar relacionada con; a) un elevado transporte de Ca^{2+} a través de las membranas de TT mediante la acción de sus bombas de Ca^{2+} o, b) un aumento en la salida pasiva de Ca^{2+} a través de los TT. Esta última sugerencia es poco probable por la dirección del gradiente de concentración del Ca^{2+} . En los músculos sin entrenamiento, como los que usamos para los experimentos de fatiga, el bombeo de Ca^{2+} a la luz de los TT esta disminuido. De esta manera, la despolarización de membrana inactiva al sensor de voltaje y altera el AEC entre RDHP y RyR, lo cual representa un segundo factor para que no haya liberación de Ca^{2+} por RS. Sin embargo, existen fuertes evidencias, que descartan la posibilidad de una participación del Ca^{2+} extracelular, es decir,

que la $[Ca^{2+}]_{TT}$ no está asociada a la propagación del potencial de acción o a los eventos de acople excitación-contracción (5). Armstrong *et al* comprobaron, que a una $[Ca^{2+}]_e$ de $2.1 \cdot 10^{-9}$ M, cuando la fibra muscular fue estimulada cada 10s, se produjeron contracciones durante 10min por lo menos, antes de interrumpirse las contracciones por una falla eléctrica, que atribuyeron a una inactivación de la conductancia de Na^+ al caer el potencial de reposo lo suficientemente para hacer imposible la generación de los potenciales de acción (5).

Chin y Allen (27) han sugerido por experimentos de fatiga con estimulación tetánica repetitiva de baja frecuencia, que hay un aumento inicial de la integral $[Ca^{2+}]_i$ en función del tiempo. Este aumento inicial de la $[Ca^{2+}]_i$ pudiera; a) inhibir la liberación de Ca^{2+} por los canales de RyR durante la actividad contráctil, y en consecuencia habría una disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ hasta niveles inferiores que conllevan a una pérdida de la fuerza de contracción y b) favorecer la salida de Ca^{2+} a la luz de los TT y resultar en un aumento efectivo de la $[Ca^{2+}]_{TT}$ como lo han observado Bianchi y Narayan (12). En la recuperación de la fatiga hay una fase rápida que está asociada a la repolarización de la membrana por la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ , y una fase lenta que pudiera estar principalmente asociada a la homeostasis del Ca^{2+} y cuyo tiempo de recuperación es mayor de 60 minutos (27).

En los experimentos de CDB se observa un aumento en la estabilidad térmica de la transición *a* del perfil de desnaturalización de los TT de músculo fatigado, que corresponde a las bombas de Ca^{2+} . Esto podría indicar que su incapacidad para mantener un transporte adecuado se deba a cambios en su conformación, producidos a corto plazo durante la actividad prolongada. La transición *b*, que corresponde a la Mg^{2+} -ATPasa de TT de músculos fatigados no demuestra cambios importantes en su conformación ni en su

actividad hidrolítica. La transición *c*, que presumiblemente corresponde al RDHP, se desestabiliza durante la fatiga, lo cual podría significar que hubo cambios conformacionales que pudieran estar relacionados con los cambios en las distribuciones iónicas alrededor de la membrana de superficie.

Se hicieron experimentos de CDB con membranas de TT en presencia de 10mM de Ca^{2+} . El efecto del Ca^{2+} sobre las membranas de músculos fatigados fue el de revertir los cambios producidos por la fatiga, además de inducir parcialmente conformaciones similares a las observadas en músculo adaptado. Eso indica que las tres principales transiciones en los TT, que corresponden a las proteínas más abundantes en estas membranas, adquieren una conformación estable, diferente a la del control, gracias a la unión de moléculas de Ca^{2+} a sitios específicos o la modulación indirecta de estas proteínas por el Ca^{2+} . La incubación de las membranas no fatigadas con 10mM de Ca^{2+} no tuvo efecto sobre los parámetros termodinámicos y por lo tanto las conformaciones de las proteínas. Esto nos indica que para que se produzca la conformación resistente a la fatiga de las proteínas de los TT por unión de Ca^{2+} , se requiere de un factor o la expresión de alguna proteína inducida por la actividad regular (entrenamiento) o prolongada (fatiga).

CONCLUSION

Como conclusión se propone un modelo para explicar los eventos de acople excitación-contracción en el caso del músculo esquelético de un individuo entrenado (adaptado al ejercicio) y en el caso de la fatiga, el último, donde se origina una elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$, durante una actividad prolongada (Figura 28).

La PMCA1 en condiciones normales tiene una actividad muy baja, incluso latente de transporte de Ca^{2+} al exterior de la célula. Su activación se lleva a cabo por la unión de Ca^{2+} -calmodulina (Ca^{2+} -CaM) a un sitio específico. Sin embargo, la PMCA1, a diferencia

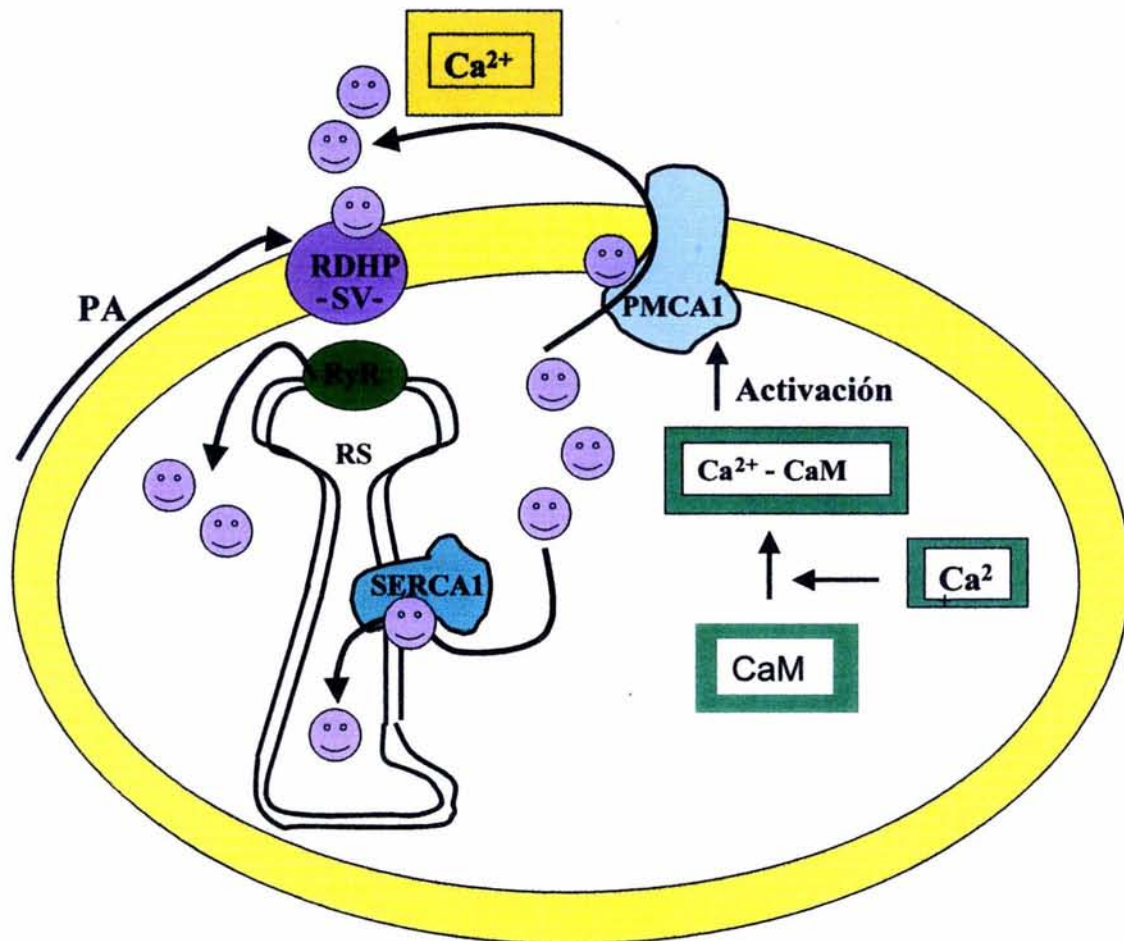


Figura 28. Modelo de AEC en adaptación y fatiga

de PMCA 2 y 3, tiene una afinidad baja por este complejo activador. Propongo, que un individuo entrenado, logró una conformación estable de su PMCA, diferente al control, como vimos mediante los estudios de CDB, que puede estar acompañada o no por un cambio en su isoforma, la cual podría atribuirle a la enzima una alta afinidad por el complejo activador Ca^{2+} -CaM. Eso explicaría el aumento en la actividad de transporte de

Ca^{2+} e hidrólisis de ATP de la ATPasa de Ca^{2+} de los TT, que podría ayudar mantener la homeostasis de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Este transporte de Ca^{2+} podría a su vez proveer moléculas de Ca^{2+} a la intermediación de un sitio extracelular de unión de Ca^{2+} del RDHP. La unión de Ca^{2+} a este sitio podría ocasionar un cambio estable en la conformación del RDHP, que le va a permitir al sensor de voltaje detectar con mayor sensibilidad potenciales de acción durante una activación prolongada, donde el potencial de membrana llega a despolarizarse por los cambios en los gradientes transmembranales de Na^+ . Además, se ha visto, que el RDHP de músculo esquelético rápido estimulado crónicamente a bajas frecuencias cambia la proporción de sus isoformas, aumentando los niveles de mRNA para la isoforma cardiaca, incluso a cantidades superiores que en músculo lento (111). Este hecho podría ser otro indicio de un cambio en el tipo de acople excitación-contracción, donde haya una mayor importancia del Ca^{2+} .

Por otro lado, en el músculo no entrenado la PMCA1 no tiene mucha afinidad por el complejo Ca^{2+} -CaM, y por lo tanto no tiene la activación necesaria para transportar Ca^{2+} al exterior de la célula, cuando se requiera, como en el caso de un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que ocurre durante la actividad prolongada. El resultado podría ser la inhibición de la liberación de Ca^{2+} por los RyR y la inhibición de la captura de Ca^{2+} por SERCA, con la consecuente presentación de fatiga muscular.

PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar los estudios de captura de Ca^{2+} , hidrólisis de ATP y calorimetría en TT y RS de músculo de conejos adaptados al ejercicio que hayan sido fatigados.
- ❖ Realizar estudios de salida de Ca^{2+} en TT y RS control, adaptados, fatigados y adaptados en fatiga.
- ❖ Medir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en músculo control y adaptado al ejercicio en reposo, ejercicio y fatiga.

Bibliografía

1. Allen DG, Kabbara AA y Westerblad H (2002) Muscle fatigue: the role of intracellular calcium stores. *Can J Appl Physiol* 1:83-96.
2. Allen DG, Lännergren J y Westerblad H (1995) Muscle cell function during prolonged activity: Cellular mechanisms of fatigue. *Exp Physiol* 80:497-527.
3. Allen G, Trinnaman BJ y Green NM (1980) The primary structure of the calcium ion-transporting adenosine triphosphatase protein of rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum. Peptides derived from digestion with cyanogen bromide, and the sequences of three long extramembranous segments. *Biochem J* 187(3):591-616.
4. Anderson K y Meissner G (1995) T-tubule depolarization-induced SR Ca^{2+} -dependent mechanisms in cell homogenates from rabbit skeletal muscle. *J Gen Physiol* 105(3):363-83.
5. Armstrong CM, Bezanilla FM y Horowicz P (1972) Twitches in the presence of ethylene-glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N-tetraacetic acid. *Biochim Biophys Acta* 267:605-608.
6. Armstrong RB, Warren GL y Warren JA (1991) Mechanisms of exercise-induced muscle fibre injury. *Sports Med* 12:184-207.
7. Baker AJ, Kostov KG, Miller RG y Weiner MW (1993) Slow force recovery after long-duration exercise: metabolic and activation factors in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 74: 2294-2300.
8. Balog EM, Thompson EV y Fitts RH (1994) Role of sarcolemma action potentials and excitability in muscle fatigue. *J Appl Physiol* 76:2157-2162.

9. Baylor SM (1983) Sarcoplasmic reticulum calcium release in frog skeletal muscle fibers estimated from Arzenazo III calcium transients. *J Appl Physiol* 74:625-666.
10. Belcastro AN, Gilchrist JS y Scrubb J (1993) Function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles with exercise. *J Appl Physiol* 75:2412-2418.
11. Bezanilla F, Caputo C y Gonzalez-Serratos H (1972) Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibers of the frog. *J Physiol* 223:509-523.
12. Bianchi CP y Narayan S (1982) Muscle fatigue and the role of transverse tubules. *Science* 215: 295-296.
13. Block BA, Imagawa T, Campbell KP y Franzini-Armstrong C (1988) Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J Cell Biol* 107(6Pt):2587-2600.
14. Brandt NR, Caswell AH, Wen SR, Talvenheimo JA (1990) Molecular interactions of the junctional foot protein and dihydropyridine receptor in skeletal muscle triads. *J Membr Biol* 113(3):237-251.
15. Briggs FN, Lee KF, Feher JJ, Wechsler AS, Ohlendieck K y Campbell K (1990) Ca^{2+} -ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. *FEBS Lett* 259(2):269-272.
16. Brum G, Fitts R, Pizarro G y Ríos E (1988) Voltage sensors of the frog skeletal muscle membrane require calcium to function in excitation-contraction coupling. *J Physiol* 398:475-505.
17. Brum G, Ríos E y Stefani E (1988) Effects of extracellular calcium movements of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle fibers. *J Physiol* 398:441-473.

18. Bruton JD, Lännergren J y Westerblad H (1998) Mechanisms underlying the slow recovery of force after fatigue: importance of intracellular calcium. *Acta Phys Scand* 162(3):285-293.
19. Bull R, Marengo JJ, Suárez-Isla BA, Donoso P, Sutko JL y Hidalgo C (1989) Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys J* 56(4):749-756.
20. Byrd SK, Bode AK y Klug GA (1989) Effects of exercise of varying duration on sarcoplasmic reticulum function. *J Appl Physiol* 66(3):1383-1389.
21. Cairns SP, Hing WA, Slack JR, Mills RG y Loiselle DS (1998) Role of extracellular $[Ca^{2+}]$ in fatigue of isolated mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 84(4):1395-1406.
22. Callaway C, Seryshev A, Wang JP, Slavik KJ, Needleman DH, Cantú C et al (1994) Localization of the high affinity $[3H]$ ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *J Biol Chem* 269(22):15876-15884.
23. Carafoli E (1997) Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res Cardiol* 92 (1):59-61.
24. Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP y Kawamoto RM (1988) Isolation of transverse tubule membranes from skeletal muscle: ion transport activity, reformation of triad junctions, and isolation of junctional spanning protein of triads. *Methods Enzymol* 157:68-84.
25. Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 521-555.

26. Chadwick CC, Inui M y Fleischer S (1988) Identification and purification of a transverse tubule coupling protein which binds to the ryanodine receptor of terminal cisternae at the triad junction in skeletal muscle. *J Biol Chem* 263(22):10872-10877.
27. Chin ER y Allen DG (1996) The role of elevations in intracellular Ca^{2+} in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibers. *J Physiol (Lond)* 491:813-824.
28. Chu A, Díaz-Muñoz M, Hawkes MJ, Brush K y Hamilton SL (1990) Ryanodine as a probe for the junctional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol Pharmacol* 37(5):735-741.
29. Conjard A, Peuker H y Pette D (1998) Energy state and myosin isoforms in single fibers of normal and transforming rabbit muscles. *Pflügers Arch* 436: 962-969.
30. Cullis PR y de Kruijff B (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim Biophys Acta* 559(4):399-420.
31. Dean W, Chen D, Brandt P y Vanaman TC (1997) Regulation of platelet plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by cAMP-dependent and tyrosine phosphorylation *J Biol Chem* 272:15113-15119.
32. Donoso P, Prieto H e Hidalgo C (1995) Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. *Biophys J* 68(2):507-515.
33. Dulhunty AF, Junankar PR, Eager Kr, Ahern GP y Laver DR (1996) Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of the striated muscle. *Acta Physiol Scand* 156(3):375-385.
34. Everts M, Anderson JP, Clausen T y Hansen O (1989) Quantitative determination of Ca^{2+} dependent Mg^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum in muscle biopsies. *Biochemical J* 260:443-445.

35. Favero TG (1999) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release and muscle fatigue. *J Appl Physiol* 87(2):471-483.
36. Favero TG, Pessah IN y Klug GA (1993) Prolonged exercise reduces Ca^{2+} release from rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Pflügers Arch* 422:472-475.
37. Fitts RH (1994) Cellular mechanisms of muscle fatigue. *Physiol Rev* 74:49-94.
38. Fitts RH y Balog EM (1996) Effect of intracellular and extracellular ion changes on E-C coupling and skeletal muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* 156:169-181.
39. Fitts RH, Courtwright JB, Kim DH y Witzman FA (1982) Muscle fatigue with prolonged exercise: contractile and biochemical alterations. *Am J Physiol (Cell Physiol)* 242:C65-C73.
40. Froemming GR, Murray BE y Ohlendieck K (1999) Self-aggregation of triadin in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1418(1):197-205.
41. Froemming GR, Murray BE, Harmon S, Pette D y Ohlendieck K (2000) Comparative analysis of the isoform expression pattern of Ca^{2+} -regulatory membrane proteins in fast-twitch, slow-twitch, cardiac, neonatal and chronic low-frequency stimulated muscle fibers. *Biochim Biophys Acta* 1466(1-2):151-168.
42. Gao S, Chen J, Brodsky SV, Huang H, Adler S, Lee JH, Dhadwal N, Cohen-Gould L, Gross SS y Goligorsky MS (2002) Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: A pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria. *J Biol Chem* 279(16):15968-15974.

43. Garcia MC, Gonzalez-Serratos H, Morgan JP, Perreault CL y Rozycka M (1991) Differential activation of myofibrils during fatigue in phasic skeletal muscle cells. *J Muscle Res Cell Mot* 12: 412-424.
44. Gillis JM (1985) Relaxation of vertebrate skeletal muscle. A synthesis of the biochemical and physiological approaches. *Biochim Biophys Acta* 811:97-145.
45. Glukhovskiy A, Amitzur G, Adam D y Sideman S (1995) A model of Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol* 382:97-108.
46. Gonzalez-Serratos H, Valle-Aguilera R, Lathrop DA y Garcia MC (1982) Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. *Nature* 298(5871):292-294.
47. Green HJ (1998) Cation pumps in skeletal muscle: potential role in muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* 162(3): 201-213.
48. Green HJ, Ballantyne CS, MacDougall JD, Tarnopolsky MA y Schertzer JD (2003) Adaptations in human muscle sarcoplasmic reticulum to prolonged submaximal training. *J Appl Physiol* 94: 2034-2042.
49. Green HJ, Grange F, Chin C, Goreham C y Ranney D (1998) Exercise-induced decreases in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity attenuated by high-resistance training. *Acta Physiol Scand* 164:141-146.
50. Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wiehrer W y Pette D (1984) Exercise-induced fiber type transitions with regard to myosin, parvalbumin and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflügers Arch* 400: 432-438. A
51. Groh S, Marty I, Ottolia M et al (1999) Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* 274(18):12278-12283.

52. Guerini D (1998) The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase. *Cell Tissue Res* 292:191-197.
53. Guo W, Jorgensen AO y Campbell KP (1994) Characterization and ultrastructural localization of a novel 90-kDa protein unique to skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 269(45):28359-28365.
54. Han JR, Thieleczek R, Varsanyi M y Heilmeyer Jr (1992) Compartmentalized ATP synthesis in skeletal muscle triads. *Biochemistry* 321:377-384.
55. Hidalgo C (1985) Lipid phase of transverse tubule membranes from skeletal muscle. An electron paramagnetic resonance study. *Biophys J* 47(6):757-764.
56. Hidalgo C, Aracena P, Sanchez G y Donoso P (2002) Redox regulation of calcium release in skeletal and cardiac muscle. *Biol Res* 35(2):183-93.
57. Hidalgo C, Carrasco MA, Magendzo K y Jaimovich E (1986) Phosphorilation of phosphatidylinositol by transverse tubules vesicles and its possible role in excitation-contraction coupling. *FEBS Lett* 202(1):69-73.
58. Hidalgo C, Gonzalez ME y Lagos R (1983) Characterization of the Ca^{2+} - or Mg^{2+} -ATPase of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 258(22):13937-13945.
59. Hidalgo C, Jorquera J, Tapia V y Donoso P (1993) Triads and transverse tubules isolated from skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-triphosphate. *J Biol Chem* 268(20):15111-15117.
60. Hidalgo C, Parra C, Riquelme R y Jaimovich E (1986) Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. *Biochim Biophys Acta* 855:79-88.

61. Hogan MC, Gladden LB, Kurdak SS y Poole DC (1995) Increased [lactate] in working dog muscle reduces tension development independent of pH. *Med Sci Sports Exerc* 27:317-377.
62. Holloszy JO y Coyle EF (1984) Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56:831-838.
63. Ikemoto N y el-Hayek R (1998) Signal transmission and transduction in excitation-contraction coupling. *Adv Exp Med Biol* 453:199-207.
64. Imagawa T, Smith JS, Coronado R y Campbell KP (1987) Purified ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} - permeable pore of the calcium release channel. *J Biol Chem* 262(34):16636-43.
65. Inashima S, Matsunaga S, Yasuda T y Wada M (2003) Effect of endurance training and acute exercise on sarcoplasmic reticulum function in rat fast- and slow twitch skeletal muscles. *Eur J Appl Physiol* 89(2):142-149.
66. Inesi G, Kurzmack M, Coan C y Lewis DE (1980) Cooperative calcium binding and ATPase activation in sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 255(7):3025-31.
67. Inesi G, Kurzmack M, Kosk-Kosicka D, Lewis D, Scofano H y Guimaraes-Motta H (1982) Equilibrium and kinetic studies of calcium transport and ATPase activity in sarcoplasmic reticulum. *Z Naturforsch [C]* 37(7-8):685-91.
68. Iino M (1999) Dynamic regulation of intracellular calcium signals through calcium release channels. *Mol Cell Biochem* 190(1-2):185-190.
69. Inui M, Saito A y Fleischer S (1987) Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J Biol Chem* 262(4): 1740-1747.

70. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO y Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270(51):30787-30796.
71. Jones DA (1996) High- and low-frequency fatigue revised. *Acta Physiol Scand* 156:265-270.
72. Jorgensen AO, Shen AC, Arnold W, Leung AT y Campbell KP (1989) Subcellular distribution of the 1,4-dihydropyridine receptor in rabbit skeletal muscle in situ. An immunofluorescence and immunocolloidal gold-labeling study. *J Cell Biol* 109(1):135-147.
73. Jorgensen AO, Arnold W, Shen AC, Yuan SH, Gaver M y Campbell KP (1990) Identification of novel proteins unique to either transverse tubules (TS28) or the sarcolemma (SL50) in rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol.* 110(4):1173-1185.
74. Juel C (1986) Potassium and sodium shifts during in vitro isometric muscle contraction, and the time course of the ion-gradient recovery. *Pflügers Arch* 406:458-463.
75. Kim KC, Caswell AH, Talvenheimo JA y Brandt NR (1990) Isolation of a terminal cisterna protein which may link the dihydropyridine receptor to the junctional foot protein in skeletal muscle. *Biochemistry* 29(39):9281-9289.
76. Kjeldsen K, Richter EA, Galbo H, Lortie G y Clausen T (1986) Training increases the concentration of [³H] ouabain-binding sites in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 860(3): 708-712.

77. Lai FA, Misra M, Xu L, Smith HA y Meissner G (1989) The ryanodine receptor - Ca^{2+} release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for a cooperatively coupled, negatively charged homotetramer. *J Biol Chem* 264(28):16776-16785.
78. Lamb GD, Junankar PR y Stephenson DG (1995) Raised intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ abolishes excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of rat and toad. *J Physiol* 489:349-362.
79. Lamb GD, Stephenson DG (1996) Effects of FK506 and rapamycin on excitation-contraction coupling in skeletal muscle fibers of the rat. *J Physiol* 494 (Pt 2):569-76.
80. Lännergren J y Westerblad H (1986) Force and membrane potential during and after fatiguing, continuous high frequency stimulation of single *Xenopus* muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 129:311-318.
81. Leong P y MacLennan Dh (1998) A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* 273(14):7791-7794.
82. Leong P y MacLennan Dh (1998) The cytoplasmic loops between domains II and III and domains III and IV in the skeletal muscle dihydropyridine receptor bind to a contiguous site in the skeletal muscle ryanodine receptor. *J Biol Chem* 273(45):29958-29956.
83. Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen ML, Waters B y Cheng KH (1990) Thermal denaturation of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29(3):681-689.

84. Leung AT, Imagawa T, Campbell KP (1987) Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca^{2+} channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem* 262(17):7943-7946.
85. Li JL, Wang XN, Fraser SF, Carey MF, Wrgley TV y McKenna MJ (2002) Effects of fatigue and training on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} regulation in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 92(3):912-922.
86. Lu X, Xu L y Meissner G (1995) Phosphorylation of dihydropyridine receptor II-III loop peptide regulates skeletal muscle calcium release channel function. Evidence for an essential role of the beta-OH group of Ser687. *J Biol Chem* 270(31):18459-18464.
87. Ma J, Fill M, Knudson CM, Campbell KP y Coronado R (1988) Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction type channel. *Science* 242(4875):99-102.
88. MacLennan DH (1970) Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245(17):4508-4518.
89. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B y Green NM (1985) Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316 (6030):696-700.
90. Mac Lennan DH y Holland PC (1975) Calcium transport in sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biophys Bioeng* 4(00):377-404.
91. Malouf NN y Meissner G (1979) Localization of a Mg^{2+} - or Ca^{2+} -activated ("basic") ATPase in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 122(2):233-250.
92. Manery JF, Dryden EE, Still JS y Madapallimattam G (1984) Characteristics of skeletal muscle ecto-ATPase in situ. *Can J Biochem Cell Biol* 62(10): 1015-26.

93. Marx SO, Ondrias K y Marks AR (1998) Coupled gating between individual skeletal muscle Ca^{2+} release channels. *Science* 281(5378):818- 821.
94. Mc Kenna MJ Harmer AR, Fraser SF y Li JI (1996). Effects of training on potassium, calcium and hydrogen ion regulation in skeletal muscle and blood during exercise. *Acta Physiol Scand* 156:335-346.
95. Meissner G, Ríos E, Tripathy A y Pasek D (1997) Regulation of skeletal muscle Ca^{2+} release channels (ryanodine receptor) by Ca^{2+} and monovalent cations and anions. *J Biol Chem* 272:1628-1638.
96. Michalak M, Dupraz P y Shoshan-Barmatz V (1988) Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 939(3):587-594.
97. Michalak M, Famulski K y Carafoli E (1984) The Ca^{2+} -pumping ATPase in skeletal muscle sarcolemma. Calmodulin dependence, regulation by cAMP-dependent phosphorylation and purification. *J Biol Chem* 259(24):15540-15547.
98. Murray BE, Froemming GR, Maguire PB y Ohlendieck K (1998) Excitation-contraction-relaxation cycle: Role of Ca^{2+} -regulatory membrane proteins in normal, stimulated and pathological skeletal muscle (review). *Int J Mol Med* 1(4):677-687.
99. Nakai J, Dirksen RT, Nguyen HT, Pessah IN, Beam KG y Allen PD (1996) Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 380(6569):72-75.
100. Nielsden JJ, Mohr M, Klarskov C, Kristensen M, Krustrup P, Juel C y Bangsbo J (2003) Effects of high-intensity intermittent training on potassium kinetics and performance in human skeletal muscle. *J Physiol* (pub próxima).

101. O'Driscoll S, McCarthy TV, Eichinger HM, Erhardt W, Lehman-Horn F y Herrmann H (1996) Calmodulin sensitivity of the sarcoplasmic reticulum receptor from normal and malignant-hyperthermia-susceptible muscle. *Biochem J* 319:421-426.
102. O'Reilly C, Pette D y Ohlendieck K (2003) Increased expression of the nicotinic acetylcholine receptor in stimulated muscle. *Biochem and Biophys Res Comm* 300:585-591.
103. Ohlendieck K, Briggs FN, Lee KF, Wechsler AW y Campbell KP (1991) Analysis of excitation-contraction coupling components in chronically stimulated canine skeletal muscle. *Eur J Biochem* 202(3):739-747.
104. Ohlendieck K, Murray BE, Froemming GR, Maguire PB, Leisner E, Traub I and Pette D (1999) Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca^{2+} -regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflügers Arch* 438: 700-708.
105. Okamoto VR, Moulton MP, Runte EM, Kent CD, Lebherz HG, Dahms AS, Sabbadini RA (1985) Characterization of transverse tubule membrane proteins: tentative identification of the Mg-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 237(1):43-54.
106. Ortega A y Lepock JR (1995) Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1233(1):7-13.
107. Ortega A, Gonzalez-Serratos H, y Lepock JR (2000) Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase. *Am J Physiol* 279 (Cell Physiol.): C166-C172.
108. Ortenblad N, Lunde PK, Levin K, Andersen JL y Pedersen PK (2000) Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release following intermittent sprint training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(1):R152-160.

109. Oz M y Frank GB (1991) Decrease in the size of tetanic responses produced by nitrendipine or by extracellular calcium ion removal without blocking twitches or action potentials in skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 257(2):575-581.
110. Pereon Y, Dettbarn C, Lu Y, Westlund KN, Zhang JT y Palade P (1998) Dihydropyridine receptor isoform expression in adult rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 436(3):309-314.
111. Pereon Y, Navarro J, Hamilton M, Booth FW y Palade P (1997) Chronic Stimulation Differentially Modulates Expression of mRNA for Dihydropyridine Receptor Isoforms in Rat Fast Twitch Skeletal Muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 217-222.
112. Pessah IN y Zimanyi I (1991) Characterization of multiple [3H]ryanodine binding sites on the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol Pharmacol* 39(5):679-689.
113. Pessah IN, Francini AO, Scales DJ, Waterhouse AL y Casida JE (1986) Calcium-ryanodine receptor complex. Solubilization and partial characterization from skeletal muscle junctional sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 261(19):8643-8648.
114. Pette D (2001) Historical Perspectives: Plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol* 90:1119-1124.
115. Pizarro G, Fitts R, Uribe I y Ríos E (1989) The voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 94:405-428.

116. Qi Y, Ogunbunmi EM, Freund EA, Timerman APP y Fleischer S (1998) FK-binding protein associated with the ryanodine receptor of skeletal muscle in vertebrate animals. *J Biol Chem* 273(52):34813-34819.
117. Radzyukevich T, Lipska E, Pavelkova J y Zacharova D (1993) Characterization of tension decline in different types of fatigue-resistant skeletal muscle fibers of the frog. Low extracellular calcium effects. *Gen Physiol Biophys* 12(5):473-490.
118. Reid MB (1996) Reactive oxygen and nitric oxide in skeletal muscle. *News Physiol Sci* 11:114-119.
119. Ríos E y Brum G (1987) Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325(61069):717-720.
120. Ríos E, Karhanek M, Ma J y González A (1993) An allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 102(3):449-481.
121. Roseblatt M, Hidalgo C, Vergara C e Ikemoto N (1981) Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 256(15):8140-8148.
122. Sabbadini RA y Dahms AS (1989) Biochemical properties of isolated transverse tubular membranes. *J Bioenerg Biomembr* 21(2):163-213.
123. Saborido A, Moro G y Megias A (1991) Transverse tubule Mg^{2+} -ATPase of skeletal muscle. Evidence for extracellular orientation of chicken and rabbit enzymes. *J Biol Chem* 266:23490-23498.
124. Sacchetto R, Maegreth A, Pelosi M y Carafoli E (1996) Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the

- sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of the transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 237: 483-488.
125. Saiki Y, el-Hayek R e Ikemoto N (1999) Involvement of the Glu 724-Pro760 region of the dihydropyridine receptor II-III loop in skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *J Biol Chem* 274(12):7825-7832.
 126. Saito A, Iniu M, Radermacher M, Frank J y Fleischer S (1988) Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 107(1):211-219.
 127. Samsó M (1998) Contributions of electron microscopy and single particle techniques to the determination of the ryanodine receptor three-dimensional structure. *J Struct Biol*, 121:172-80.
 128. Sánchez X, Carrasco MA, Vergara J y Hidalgo C (1991) Inositol 1,4,5,-triphosphate activity in membranes isolated from amphibian skeletal muscle. *FEBS Lett* 279(1):58-60.
 129. Sen CK (1995) Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*, 79:675-686.
 130. Siniestra G, Steven A, Escaravage M, Konjeti R, Sekhar M, Freeman ML, Borrelli M, y Lepock JR (1997) Destabilization of the Ca^{2+} -ATPase of Sarcoplasmic Reticulum by Thiol-Specific, Heat Shock Inducers Results in Thermal Denaturation at 37 °C. *Biochemistry* 36: 11002-11011.
 131. Stephenson G, Lamb GD y Stephenson GMM (1998) Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast- and slow-twitch mammalian muscle fibers relevant to muscle fatigue. *Acta Physiol Scand* 162:229-245.

132. Stern MD, Pizarro G y Ríos E (1997) Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol* 110(4):415-440.
133. Suarez-Isla BA, Iribarra V, Oberhauser A, Larralde L, Bull R, Hidalgo C y Jaimovich E (1988) Inositol (1,4,5)-triphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum membranes. *Biophys J* 54(4):737-741.
134. Sun J, Xu L, Eu JP, Stamler JS y Meissner G (2001) Classes of Thiols That Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel. *J Biol Chem* 276(19):15625-15630.
135. Szegedi C, Sarkozi S, Herzog A, Jona I y Varsanyi M (1999) Calsequestrin: more than only a luminal Ca^{2+} buffer inside the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 337(Pt 1):19-22.
136. Takekura H, Takeshima H, Nishimura S et al (1995) Co-expression in CHO cells of two muscle proteins involved in excitation-contraction coupling. *J Muscle Res Cell Motil* 16(5):465-480.
137. Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M et al (1989) Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339(6224):439-445.
138. Takeshima H, Shimuta M, Komazaki S et al (1998) Mitsugumin29, a novel synaptophysin family member from the triad junction in skeletal muscle. *Biochem J* 331 (Pt 1):317-322.
139. Toyoshima C, Asahi M, Sugita Y, Khanna R, Tsuda T y MacLennan DH (2003) Modeling of the inhibitory interaction of phospholamban with the Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl acad Sci* 100: 467-472.

140. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H y Ogawa H (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647 – 655.
141. Treuheit MJ, Vaghy PL y Kirley TL (1992) Mg²⁺-ATPase from rabbit skeletal muscle transverse tubules is 67-kilodalton glycoprotein. *J Biol Chem* 267:11777-11782.
142. Tripathy A, Xu L, Mann G y Meissner G (1995) Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* 69(1):106-19.
143. Valente AP, Barrabin H, Jorge RV, Paes MC y Scofano, HM (1990) Isolation and characterization of the Mg²⁺-ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane preparations. *Biochim Biophys Acta* 1039(3):297-304.
144. Vilven J y Coronado R (1988) Opening of dihydropyridine Ca²⁺ channels in skeletal muscle membranes by inositol triphosphate. *Nature*, 336(6199):587-589.
145. Volpe P, Salviati G, Di Virgilio F y Pozzan T (1985) Inositol 1, 4, 5-triphosphate induces calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature* 316(6026):347-349.
146. Westerblad H y Allen DG (1996) Changes of tetanic [Ca²⁺] in isolated skeletal muscle fibers with drugs and fatigue. *Acta Physiol Scand* 156407-156416.
147. Westerblad H, Duty S y Allen DG (1993) Intracellular calcium concentration during low-frequency fatigue in isolated single fibers of mouse skeletal muscle. *J Appl Physiol* 75(1):382-388.
148. Westerblad J y Allen DG (1992) Myoplasmic free Mg²⁺- concentration during repetitive stimulation of single fibers from mouse skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 453:413-434.

149. Westerblad H y Lännergren J (1986) Force and membrane potential during and after fatiguing, intermittent tetanic stimulation of single *Xenopus* muscle fibers. *Acta Physiol Scand* 128:369-378.
150. Williams JH (1997) Contractile apparatus and sarcoplasmic reticulum function: effects of fatigue, recovery and elevated Ca^{2+} . *J Appl Physiol* 83:444-450.
151. Wilson JA, Kronfeld DS, Gay LS, Williams JH, Wilson TM y Lindinger MI (1998) Sarcoplasmic reticulum responses to repeated sprints are affected by conditioning of horses. *J Anim Sci* 76:3065-71.
152. Yamaguchi N y Kasai M (1998) Identification of 30kDa calsequestrin-binding protein, which regulates calcium release from sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* 335(Pt3):541-547.
153. Yamaguchi N, Kawasaki T y Kasai M (1995) DIDS binding 30-kDa protein regulates the calcium release channel in the sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 210(3):648-653.
154. Yano M, elHayek R e Ikemoto N (1995) Effects of perchlorate on depolarization-induced conformational changes in the junctional foot protein and Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 34(39):12584-12589.
155. Yasuda T, Inashima S, Sasaki S, Kikuchi K, Nihata S, Wada M y Katsuta S (1999) Effects of exhaustive exercise on biochemical characteristics of sarcoplasmic reticulum from rat soleus muscle. *Acta Physiol Scand* 165:45-50.
156. Zimanyi I, Buck E, Abramson JJ, Mack MM y Pessah IN (1992) Ryanodine induces persistent inactivation of the Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Mol Pharmacol* 42(6):1049-1057.

Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase

ALICIA ORTEGA,^{1,2,3} V. M. BECKER,¹ R. ALVAREZ,¹ J. R. LEPOCK,² AND H. GONZALEZ-SERRATOS³

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, México; ²Departments of Biology and Physics, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada N2L 3G1; and ³Department of Physiology, University of Maryland, Baltimore, Maryland 21201

Received 14 April 1999; accepted in final form 24 January 2000

Ortega, Alicia, V. M. Becker, R. Alvarez, J. R. Lepock, and H. Gonzalez-Serratos. Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C166–C172, 2000.—Experiments were performed to determine whether the organic Ca^{2+} channel blocker D-600 (gallopamil), which penetrates into muscle cells, affects sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} uptake by directly inhibiting the light SR Ca^{2+} -ATPase. We have previously shown that at 10 μM , D-600 inhibits LSR ATP-dependent Ca^{2+} uptake by 50% but has no effect on ATPase activity (21). These data suggest that the SR Ca^{2+} -ATPase might be a potential target for D-600. The ATPase activity of the enzyme is associated with its hydrophilic cytoplasmic domain, whereas Ca^{2+} binding and translocation are associated with the transmembrane domain (18). In the present experiments, we determined which of the two domains of the ATPase is affected by D-600. Thermal inactivation experiments using the SR Ca^{2+} -ATPase demonstrated that D-600 decreased the thermal stability of Ca^{2+} transport but had no effect on the stability of ATPase activity. In addition, D-600 at a concentration of 160 μM did not have any leaking effect of Ca^{2+} on the Ca^{2+} -loaded SR. Thermal denaturation profiles of SR membranes revealed that D-600 interacts directly with the transmembrane domain of the Ca^{2+} -ATPase. No evidence for interaction with the nucleotide domain was obtained. We conclude that the Ca^{2+} blocker D-600 inhibits the SR Ca^{2+} pump specifically by interacting with the transmembrane Ca^{2+} -binding domain of the Ca^{2+} -ATPase.

calcium channel blocker; thermal denaturation profiles; transmembrane domain

IN SKELETAL MUSCLE CELLS both the magnitude and time course of the contraction-relaxation cycle depend on the levels of the cytosolic-free Ca^{2+} concentration, which is controlled by the transverse tubules and sarcoplasmic reticulum (SR) membranes. It has been shown that in skeletal muscle nearly all the voltage-dependent Ca^{2+} channels are localized in the transverse tubular membrane system (1, 2). The voltage-dependent Ca^{2+} channels give rise to inward Ca^{2+} currents (I_{Ca}) that can be inhibited by a diverse class of organic compounds, conventionally grouped together

as Ca^{2+} antagonists or Ca^{2+} channel blockers. The interaction of such drugs with voltage-dependent Ca^{2+} channels has been extensively studied (9–11). It has been proposed that organic Ca^{2+} channel antagonists exert their inhibitory effect by promoting a type of gating in which the channels are unable to open. Colvin et al. (5) and Wang et al. (24) have shown that relatively high concentrations (0.1 and 3 mM) of verapamil, an organic Ca^{2+} blocker from the fenylalkylamine series, may interact with the SR. However, they did not determine the mechanism of interaction between verapamil and the SR.

We have previously reported that another type of organic Ca^{2+} channel blocker, diltiazem, produces up to an 80% twitch potentiation in frog skeletal muscle cells (14). We attributed this potentiation to a decrease in the rate of Ca^{2+} uptake by the SR. This hypothesis was confirmed using split muscle fibers in which we showed that diltiazem tends to maintain a high level of cytosolic-free Ca^{2+} by exerting an inhibitory effect on Ca^{2+} uptake by the SR (12).

The Ca^{2+} antagonist D-600 is more frequently used than other Ca^{2+} channel antagonists to study its effect on skeletal muscle I_{Ca} , excitation-contraction coupling, and the mechanisms by which they may produce these effects (1, 2, 6, 8, 12–15, 19, 22). For this reason and for our previous study (21), we chose D-600. It is interesting to note that D-600 has been used more despite the fact that other organic Ca^{2+} channel blockers are more efficient and widely used in clinical applications. We have recently reported an inhibitory effect of D-600 on force development in skinned skeletal muscle fibers and on Ca^{2+} uptake by isolated SR (22). These observations, along with the fact that D-600 penetrates into cells (12), may explain the facilitation of excitation-contraction coupling seen with D-600 by other researchers (6).

The present study was undertaken to determine whether the inhibitory effect of D-600 on Ca^{2+} uptake by the SR is caused by a direct interaction with the SR

Address for reprint requests and other correspondence: A. Ortega, Dept. de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, A. P. 70–159, C. P. 04510 (E-mail: aortega@servidor.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Ca^{2+} -ATPase. The experiments were performed in isolated light SR (LSR) vesicles from rabbit skeletal muscle in which ATPase, Ca^{2+} uptake activities, and Ca^{2+} leakage were measured. We also determined the effect of D-600 on the denaturation profile of the Ca^{2+} -ATPase in LSR. This paper provides evidence of a direct interaction between D-600 and the transmembrane domain of the SR Ca^{2+} -ATPase.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of LSR. Microsomes, isolated from rabbit skeletal muscle, were loaded on a discontinuous sucrose gradient composed of three layers, 25, 27.5, and 35% (wt/vol), containing 20 mM Tris-malate and 1 mM dithiothreitol (DTT), pH 6.8. The microsomes were then centrifuged for 14 h at 23,000 rpm. The lighter bands were discarded, and the pellet was washed and loaded on the top of a second discontinuous sucrose gradient of 28, 32, 35, and 45% (wt/vol). The fraction separated at the 32/35% interface, which contains the highest specific Ca^{2+} -ATPase activity (21), was collected. This fraction is hereafter referred to as LSR. LSR has a protein content of ~90% Ca^{2+} -ATPase.

ATPase activity. ATPase activity in LSR was determined by a colorimetric technique, based on the reaction between P_i and malachite green (15). Aliquots of 0.003 mg/ml LSR were incubated in a solution containing (in mM): 0.1 CaSO_4 or 1 EGTA, 5 MgSO_4 , 77 potassium methanesulfonate, 20 Tris-malate, and 1 NaATP, pH 6. The reaction was stopped after 30 min of reaction with a solution containing 0.045% hydrochloride malachite green, 4.2% ammonium molybdate in 4 N HCl, 0.8 ml Triton X-100 (10% for each 100 ml of solution), and 0.25 ml sodium citrate (34%), and the absorbance was read at 660 nm.

Calcium uptake. SR Ca^{2+} uptake was determined using the metallochromic indicator Arsenazo III in a Cl^- -free solution containing (in mM) 0.1 CaSO_4 , 5 MgSO_4 , 77 potassium methanesulfonate, 20 Tris-malate, 1 NaATP, and 0.7 Arsenazo III, pH 6.8, as previously described (4). We used sulfates mainly because intracellular chlorine in mammalian and in amphibian skeletal muscle is very low (7) and Cl^- triggers Ca^{2+} release from SR (20). Ca^{2+} transport was determined from the change in absorbance at 660 nm. SR protein (0.05 mg/ml) was added to the reaction solution, and after a 30-s incubation, the reaction was started by adding 1 mM ATP. Ca^{2+} uptake was measured in parallel with the above reaction solution, but using 1 μCi of $^{45}\text{CaCl}_2$. The Ca^{2+} remaining in the LSR vesicles was determined by filtration, and the radioactivity was measured using a scintillation counter.

Thermal inactivation. LSR membranes (2 mg/ml) were incubated in 10% sucrose containing (in mM) 1 DTT, 20 Tris-malate, and 1 CaSO_4 , pH 6.8, and were heated at one of several fixed temperatures in a water bath for 1, 3, 5, 7, or 10 min. Ca^{2+} -ATPase activity and ATP-dependent Ca^{2+} transport at room temperature (25°C) were determined after 30 min of reaction and plotted as a function of incubation time at temperatures between 37 and 53°C. Thermal inactivation and thermal denaturation were used to demonstrate the nature of the interaction between D-600 and the LSR Ca^{2+} -ATPase. The values for Ca^{2+} transport and ATPase activity were normalized with respect to the first value obtained at each temperature after 1 min of incubation. The rate of inactivation (i.e., conversion of active to inactive enzyme) is indicated by the rate constant for inactivation, k , which varies with temperature according to the Arrhenius relation

$$k = e^{(A - E_A/RT)}$$

where A is the Arrhenius constant defined as the frequency factor, E_A the activation energy, R the gas constant, and T the absolute temperature.

The inactivation temperature (T_i) is defined as the temperature resulting in half inactivation when the temperature is increased at a rate of 1°C/min. For the thermal inactivation experiments, we heated the sample at a temperature between 35 and 70°C. The value of T_i reflects the sensitivity of the Ca^{2+} -ATPase to thermal inactivation. T_i was calculated using Eq. 1, which transforms the rate of inactivation, determined by measurements of activity as a function of time at a constant temperature, to inactivation, determined by measurements of activity as a function of temperature when this is increasing at a constant rate (18). T_i was determined so that a direct comparison could be made with the characteristics of denaturation, determined by differential scanning calorimetry at a scan rate of 1°C/min (see below) and described by T_m (the temperature of half denaturation).

Differential scanning calorimetry. The thermal denaturation profile of LSR membranes was determined by differential scanning calorimetry (DSC). A high-resolution Microcal MC2 DSC was used to obtain all scans. SR membranes (8–10 mg/ml) were heated at a rate of 1°C/min from 10 to 100°C. The samples were then cooled to 10°C and rescanned. For the DSC experiments, SR was suspended in the absence or presence of 10 to 200 μM of D-600 in the solution used for thermal inactivation. Denaturation was completely irreversible after scanning up to 100°C. Intrinsic baseline curvature was corrected by subtracting the rescan from the scan data, and a correction was made for the shift in specific heat on denaturation (C_p), as previously described (18). DSC scans were deconvoluted assuming irreversible denaturation. This procedure requires that denaturation and inactivation can be approximated by a two-state reaction of the form



that obeys pseudo first-order kinetics, and where the temperature dependence of the rate constant k is given by the Arrhenius relation. These assumptions have been shown to hold for the Ca^{2+} -ATPase of the SR (18). The fraction of each component denatured or inactivated as a function of increasing temperature at a constant rate (f_D) is given as

$$f_D[T(t)] = 1 - \exp\left\{-\frac{RT_c^2}{E_A v} \exp\left[\frac{E_A(T - T_c)}{RT_c^2}\right]\right\} \quad (1)$$

where T_c is the temperature at which $k = 1$, t is time, and v is the scan rate. The derivative of f_D as a function of temperature is proportional to the excess C_p . The curves of excess C_p as a function of temperature were deconvoluted into individual components using a recursive minimization routine (18). The T_m in the DSC of each component is defined as the temperature at which the area under the individual curve for each component is one-half of the total area.

RESULTS

The effect of 10 μM D-600 on the kinetics of ATP-dependent Ca^{2+} uptake by LSR is illustrated in Fig. 1. The complete time course of Ca^{2+} uptake is inhibited by 50% at 30 min. Such an inhibition of Ca^{2+} uptake could reflect an interaction of D-600 with either the Ca^{2+} -ATPase nucleotide-binding domain, with a subsequent inhibition of ATP hydrolysis, or the Ca^{2+} -ATPase trans-

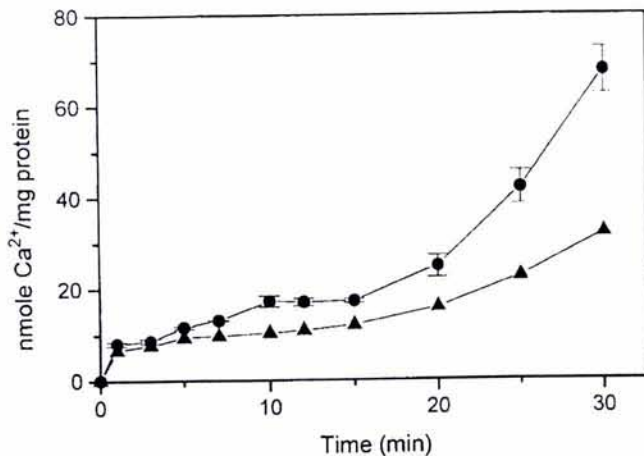


Fig. 1. Effect of 10 μ M of D-600 on ATP-dependent Ca^{2+} uptake by light sarcoplasmic reticulum (LSR) as a function of time (Δ). ATP-dependent Ca^{2+} uptake is shown in the absence of D-600 (\bullet). Aliquots of 0.05 mg/ml of LSR were incubated in a medium containing (in mM): 5 $MgSO_4$, 77 potassium methanesulfonate, 20 Tris-malate, 2 NaATP, and 0.1 $CaSO_4$ in the presence of 1 μ Ci $^{45}Ca^{2+}$, pH 6.8. For further details see MATERIALS AND METHODS. Values are means \pm SE ($n = 5$). SE bars in the presence of D-600 are within the symbols.

membrane Ca^{2+} -binding domain, with subsequent inhibition of Ca^{2+} translocation. The Ca^{2+} -ATPase activity in LSR was measured to determine whether D-600 affects the ATP hydrolytic activity. As shown in Fig. 2, D-600, at concentrations up to 160 μ M, had no inhibitory effect on the ATPase activity. This result suggested that the interaction of D-600 with the ATPase might be at a site other than the nucleotide-binding site without affecting the ATP hydrolytic activity.

D-600 potentiates the thermal inactivation of Ca^{2+} uptake, but not ATPase activity. To investigate in more detail whether D-600 interacts with the ATP-binding domain or the Ca^{2+} -binding domain, we used thermal

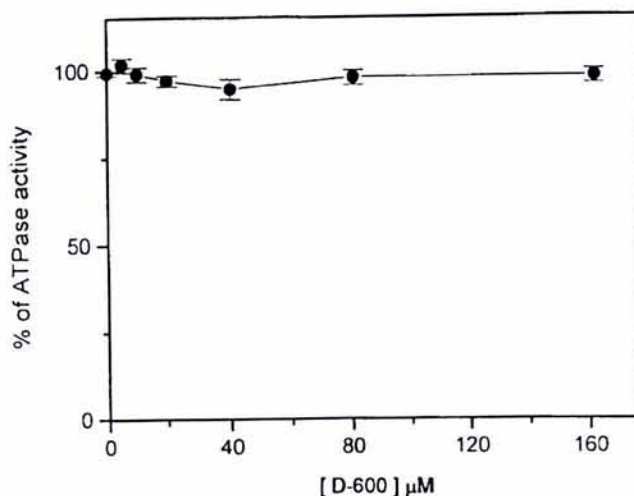


Fig. 2. Ca^{2+} -ATPase activity as a function of D-600 concentration. Aliquots of 0.003 mg/ml of LSR vesicles were incubated during 30 min in a solution containing (in mM) 0.1 $CaSO_4$, 5 $MgSO_4$, 77 potassium methanesulfonate, 20 Tris-malate, and 2 NaATP, pH 6.8. Values are means \pm SE ($n = 5$).

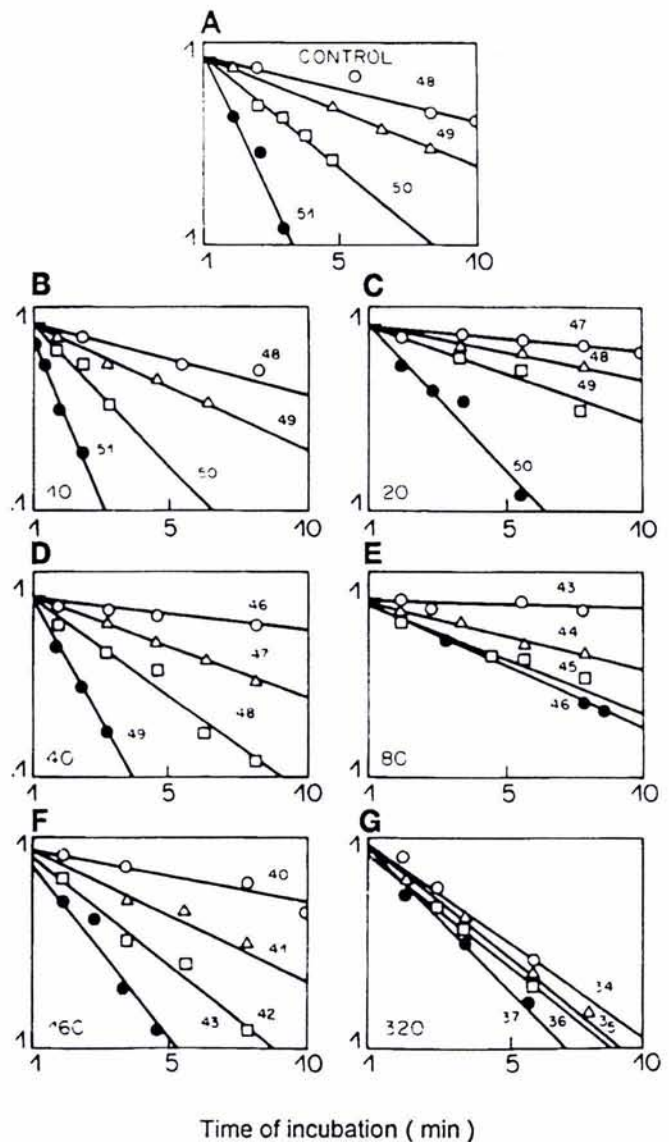


Fig. 3. Thermal inactivation of Ca^{2+} uptake (activity vs. time). Aliquots of 0.05 mg/ml of LSR vesicles were incubated for different times at 4 different temperatures (indicated within each panel in $^{\circ}C$) in the absence (A) or presence (B-G) of the following micromolar concentrations of D-600: (B) 10, (C) 20, (D) 40, (E) 80, (F) 160, and (G) 320. The incubation solution contained (in mM) 0.1 $CaSO_4$, 5 $MgSO_4$, 77 potassium methanesulfonate, and 20 Tris-malate, pH 6.8. The reaction was started by the addition of 1 mM NaATP.

analysis techniques (i.e., thermal inactivation and differential scanning calorimetry) that have been previously used to distinguish between these domains in the Ca^{2+} -ATPase of the SR (18). To determine whether D-600 (10–320 μ M) has a direct effect on Ca^{2+} -uptake activity, we performed thermal inactivation experiments on LSR by measuring how much of the activity at 25 $^{\circ}C$ remained after LSR membranes were incubated for 1, 3, 5, 7, or 10 min at four different temperatures. Figure 3 illustrates the behavior of thermal inactivation of Ca^{2+} uptake in the absence (A) and presence (B-G) of D-600. The activity decays exponen-

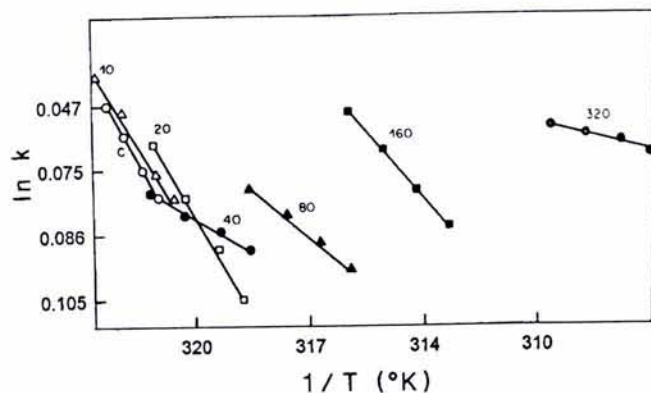


Fig. 4. Arrhenius plots of the rate constants (obtained from Fig. 3) for inactivation of LSR Ca^{2+} uptake. Plots are shown for control membranes (C) and for membranes incubated with increasing concentrations of D-600 (10–320 μ M), as indicated.

tially with time, demonstrating pseudo first-order kinetics. Figure 3 also shows that the rate of inactivation (slope) of Ca^{2+} uptake is temperature dependent. At any temperature, inactivation was faster in membranes incubated with D-600 than in those incubated without the drug.

The rate constants of inactivation of Ca^{2+} uptake shown in Fig. 3 were used to obtain Arrhenius plots (Fig. 4). It is clear from these plots that the rate of thermal inactivation increases dramatically as the concentration of D-600 is increased. Linear regression analysis was used to obtain the activation energy (E_A), corresponding to the slope of the curves, and the frequency factor (A), corresponding to the intercept.

Figure 5 shows the predicted plots of the derivative of fractional inactivation as a function of temperature (df_D/dT). These plots correspond to the DSC profiles predicted for the protein domain, of which denaturation is responsible for inactivation of Ca^{2+} uptake. The values of E_A , A , and T_i , where T_i corresponds to the temperature of half-inactivation if temperature were to be increased at $1^\circ C/min$, are given in Table 1. T_i was determined from the f_D , expressed as a function of temperature (f_D vs. T), and

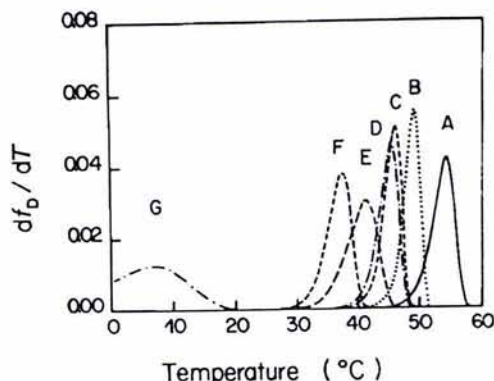


Fig. 5. The derivative of fractional inactivation of Ca^{2+} uptake as a function of temperature (df_D/dT). The curves were calculated from the E_A (slope) and Arrhenius constant A (intercept) obtained from Fig. 4; they correspond to LSR in (A) 0, (B) 10, (C) 20, (D) 40, (E) 80, (F) 160, and (G) 320 μ M D-600.

Table 1. Activation energy and transition temperature for thermal inactivation of SR Ca^{2+} uptake

| [D-600], μ M | E_A , KJ/mol | T_i , $^\circ$ C |
|------------------|----------------|--------------------|
| 0 | 536 | 53.2 ± 0.8 |
| 10 | 718 | 48.3 ± 0.9 |
| 20 | 644 | 45.7 ± 0.5 |
| 40 | 568 | 43.7 ± 0.8 |
| 80 | 352 | 40.2 ± 0.9 |
| 160 | 439 | 36.2 ± 0.9 |
| 320 | 98 | <7 |

Values are means \pm SD; $n = 3$. [D-600], concentration of D-600; E_A , activation energy; T_i , inactivation temperature.

calculated from the values of E_A and A obtained from the Arrhenius plots using Eq. 1. As shown in Table 1, the T_i for Ca^{2+} uptake in the absence of D-600 was $53.2 [0.8^\circ C (n = 3)]$. Inactivation proceeded with a high-activation energy in excess of 500 KJ/mol, suggesting that a protein conformational change such as partial unfolding is responsible for the inactivation. This table also shows that 10 μ M of D-600 decreased the T_i for inactivation of Ca^{2+} uptake by $4.9^\circ C$, from 53.2 to $48.3 [0.9^\circ C (n = 3)]$. As the concentration of D-600 was increased up to 160 μ M, T_i progressively decreased, whereas E_A remained at a relatively constant value, suggesting that the mechanism of inactivation remains unchanged at the concentrations tested. When a concentration of 320 μ M of D-600 was used, a sharp decrease in E_A and T_i occurred. These results suggested that at very high concentrations of D-600, the mechanism of inactivation of Ca^{2+} uptake changes, probably due to an increase in the passive permeability of Ca^{2+} from the SR.

To rule out the possibility that the effect of D-600 on Ca^{2+} uptake was due to Ca^{2+} leakage, we measured passive Ca^{2+} permeability. Figure 6 shows the amount

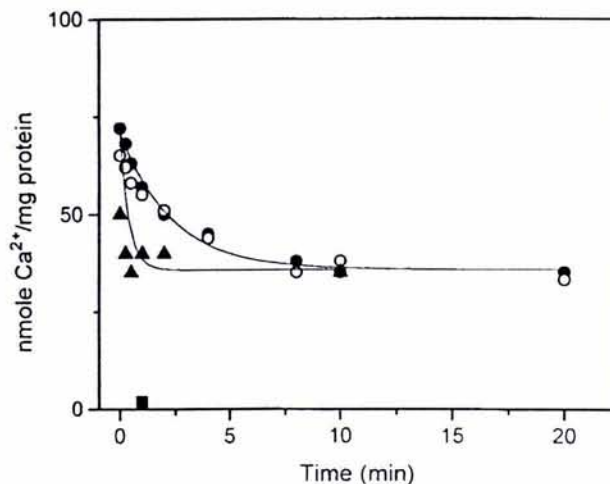


Fig. 6. Effect of D-600 on Ca^{2+} efflux from LSR in 1 mM EGTA as a function of time. Aliquots of 0.05 mg/ml of LSR were loaded with 100 μ M $CaCl_2$ and 1 mM ATP at room temperature during 30 min (MATERIALS AND METHODS). Symbols represent uptake in the absence of D-600 (\circ), in the presence of 160 μ M D-600 (\bullet), in the presence of 320 μ M D-600 (\blacktriangle), and in the presence of 1 mM ionophore A-23187 (\blacksquare). The line represents the best fit curve.

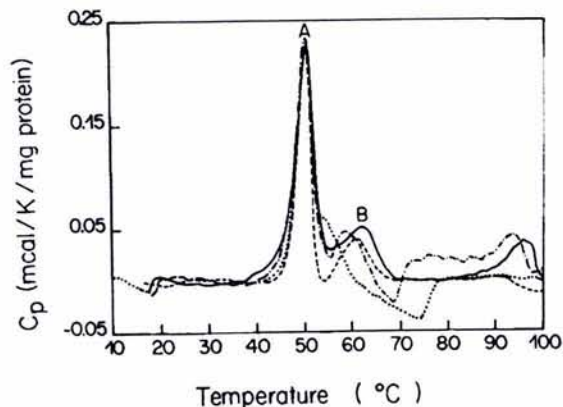


Fig. 7. Differential scanning calorimetry profiles [excess specific heat on denaturation (C_p) vs. temperature] of LSR. LSR membranes (8–10 mg/ml) were scanned with temperature increasing at a rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ in a solution containing 10% sucrose, 1 mM dithiothreitol, and 20 mM TES, either without D-600 (solid line) or with 10 μM (dashed line), 20 μM (dot-dashed line), or 80 μM (dotted line) D-600. Peaks A and B are labeled (see text for additional description).

of Ca^{2+} remaining in LSR vesicles loaded in the absence of D-600 as a function of time. Ca^{2+} -loaded vesicles were diluted in a solution containing 2 mM EGTA in the absence and presence of D-600. D-600 had no effect on passive leakage at a concentration of 160 μM . However, 320 μM of D-600 produced a sharp decrease in intravesicular Ca^{2+} . Although Ca^{2+} leaks faster in the presence of 320 μM , this does not appear to be the consequence of membrane disruption because addition of the ionophore A-23178 produced an immediate and full Ca^{2+} leakage.

To provide further evidence of a direct interaction between D-600 and the transmembrane domain of the Ca^{2+} -ATPase, which explains the inhibition of Ca^{2+} uptake, DSC was used to determine the actual site of interaction.

Differential scanning calorimetry. Lepock et al. (18) have shown that the DSC profile obtained from highly purified LSR membranes has two peaks (endotherms) corresponding to the denaturation of the cytosolic nucleotide-binding and the transmembrane Ca^{2+} -binding domains of the Ca^{2+} -ATPase. Based on these data, we also used LSR membranes to obtain a set of ATPase DSC denaturation profiles at different D-600 concentrations. Figure 7 shows the denaturation profile of LSR in which the T_m values were determined by deconvolution of the two endotherms as previously described (18). Ca^{2+} -ATPase denatures in two major endotherms. The main component, A, which corresponds to the denaturation of the cytosolic nucleotide-binding domain, had a T_m of 50°C . This component was not affected by D-600. The second component, B, which corresponds to the denaturation of the transmembrane Ca^{2+} -binding domain, had a T_m of 60 [1.01°C ($n = 3$)]. The T_m of component B was shifted to lower temperatures in the presence of D-600 (10–250 μM). A concentration of 100 μM shifted the T_m of component B up to the point at which it overlapped with the T_m of component A. However, this concentration of D-600 did not

Table 2. Transition temperature for thermal denaturation of the Ca^{2+} -ATPase: component B (Ca^{2+} -binding domain)

| [D-600], μM | T_m , $^\circ\text{C}$ |
|------------------------|--------------------------|
| 0 | 60.0 ± 0.1 |
| 10 | 58.2 ± 0.3 |
| 20 | 57.4 ± 0.4 |
| 80 | 52.4 ± 0.4 |
| 100 | 51.5 ± 0.5 |
| 250 | 51.6 ± 0.5 |

Values are means \pm SD from 3 experiments.

affect the thermal stability of the nucleotide-binding domain.

The transition temperatures at various concentrations of D-600 calculated from the denaturation profile of the Ca^{2+} -ATPase component B are given in Table 2. These results show that the transmembrane domain is the ATPase component affected by D-600. The effect of D-600 on component B is dose dependent at the same concentrations in which Ca^{2+} uptake is inhibited.

In addition to the endotherms described for components A and B, an endotherm at $\sim 95^\circ\text{C}$ was detected in some of the scans. This is likely due to the denaturation of an additional protein component. An exotherm (valley) in the region of 70 – 75°C occurred at high D-600 concentrations. The underlying cause of this exotherm is unknown.

To show that the effect of D-600 on the LSR function, specifically on the Ca^{2+} uptake, is related to a conformational change in the transmembrane domain of the ATPase, we plotted the changes in T_m of component B and the changes in T_i for Ca^{2+} uptake, both as a function of D-600 concentration (Fig. 8). Qualitatively, the curves for T_m and T_i are similar; however, T_i values are higher than T_m values. These thermal analyses results demonstrate that D-600 interacts with the transmembrane domain of the SR Ca^{2+} -ATPase, causing a conformational change that may be responsible for sensitizing the thermal inactivation of Ca^{2+} uptake in LSR.

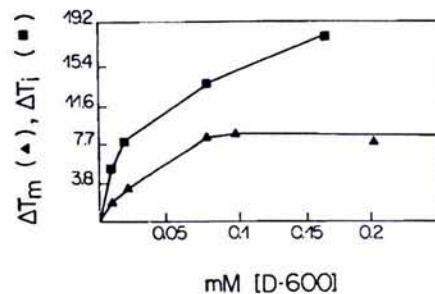


Fig. 8. Decrease in temperature of half denaturation (T_m) for peak B (see Fig. 7) as a function of D-600 concentration (▲), obtained from the differential scanning calorimetry profiles shown in Fig. 7. Decrease in inactivation temperature (T_i) for the inactivation of Ca^{2+} uptake in isolated SR (■), obtained from the curves in Fig. 3. The ordinate shows change (decrease) from the value obtained in the absence of D-600.

DISCUSSION

Our results show that D-600 1) inhibits Ca^{2+} uptake in isolated LSR membranes in a dose-dependent manner, 2) does not affect the hydrolytic activity of the Ca^{2+} -ATPase at doses in which Ca^{2+} uptake is inhibited, 3) does not affect LSR passive permeability of Ca^{2+} at concentrations up to 160 μM , 4) decreases the thermal stability of the ATP-dependent Ca^{2+} -uptake activity in a dose-dependent manner, and 5) decreases the thermal stability of the transmembrane domain of the Ca^{2+} -ATPase in a dose-dependent manner.

We conclude that the inhibition of Ca^{2+} uptake by D-600 is not the consequence of Ca^{2+} leakage because membrane permeability is not affected by the drug (Fig. 6). These results also lead us to conclude that the organic Ca^{2+} channel blocker D-600 interacts directly with the Ca^{2+} -ATPase at a concentration in which muscle fiber contractility is also affected (21). Assessing from the DSC results and the ATPase hydrolytic activity, D-600 does not affect the nucleotide-binding domain of the ATPase. Instead, the impaired thermal stability of Ca^{2+} uptake and the impaired Ca^{2+} -binding domain indicate that D-600 interacts with the ATPase transmembrane domain. These results confirm and extend our previous finding that D-600 affects SR Ca^{2+} loading in skinned muscle fibers (21). The failure of D-600 to inhibit caffeine-induced Ca^{2+} release from isolated junctional sarcoplasmic reticulum strongly supports the premise that the SR Ca^{2+} -ATPase, rather than the SR Ca^{2+} channel, is affected by this drug (21).

Lepock et al. (18) showed that in the absence of Ca^{2+} , the LSR Ca^{2+} -ATPase denatures as a single component with a T_m of 48–49°C, and in the presence of Ca^{2+} , a second component appears that denatures at a T_m of 60°C. These transitions in temperature represent the denaturation of the nucleotide-binding domain of the Ca^{2+} -ATPase (detectable by DSC and with FITC in the absence of Ca^{2+}) and denaturation of the Ca^{2+} -binding domain (detectable by DSC and by tryptophan fluorescence in the presence of Ca^{2+}), respectively (18). Previous studies by Lepock et al. (18) and Cheng and Lepock (3) have shown that a conformational change in a region of the protein closely associated with the Ca^{2+} -binding sites in the transmembrane domain causes uncoupling of Ca^{2+} transport from ATP hydrolysis. This may be due to the unfolding of a conformationally flexible site involved in Ca^{2+} translocation, but not in ATP hydrolysis before the complete unfolding of the Ca^{2+} -ATPase, as has been suggested to occur for a number of other enzymes (23). These data support our conclusion that D-600 specifically affects the transmembrane domain of the Ca^{2+} -ATPase containing the Ca^{2+} -binding sites.

The experiments presented here further support our previous results obtained in skeletal muscle fibers (21, 22) that demonstrate that D-600 has a twitch-potentiating effect. This twitch potentiation (22), observed despite the inhibitory effect of D-600 on contractures at low temperatures (8), shows that early steps in the

excitation-contraction coupling chain of events remain functional in the presence of D-600. We had previously suggested that D-600 affects muscle contraction by exerting an inhibitory effect on the SR Ca^{2+} -ATPase (22). A potential mechanism is that D-600 penetrates into the myoplasm in intact fibers and interferes with the excitation-contraction coupling mechanism by inhibiting the SR Ca^{2+} -ATPase. As a result, myoplasmic Ca^{2+} is not completely sequestered into the SR after each twitch. Consequently, cytosolic Ca^{2+} increases slightly after each activation and twitches are thus potentiated (19, 22).

Colvin et al. (5) reported that high concentrations (1 mM) of Ca^{2+} channel blockers (dihydropyridines) stimulated the Ca^{2+} -ATPase activity in isolated SR from cardiac and skeletal muscle, but no such effect was observed at lower concentrations. Wang et al. (24) also observed that verapamil, felodipine, and diltiazem at a concentration of 40 μM produced a 40–60% activation of the SR Ca^{2+} -ATPase. As we show in the present studies, 320 μM of the organic Ca^{2+} channel blocker D-600 causes LSR Ca^{2+} leakage (Fig. 6). Thus the data of Colvin et al. (5) and Wang et al. (24) could not be interpreted as the result of an increased SR Ca^{2+} leakage caused by extremely high Ca^{2+} channel blocker concentrations that produce a stimulated activity of the Ca^{2+} -ATPase. Another consequence of the increased Ca^{2+} permeability at 320 μM of D-600 is a decrement in the E_A of the Ca^{2+} -uptake activity (Fig. 5). These increments in the ATPase activity produced by these Ca^{2+} channel blockers are not consistent with the fact that at the same doses, these Ca^{2+} channel blockers inhibit Ca^{2+} uptake in SR (5, 19–22, 24). We recently found that 10–160 M diltiazem does not have any effect on the Ca^{2+} -ATPase activity in SR of fast-twitch rabbit skeletal muscle (12). Another consequence of the increased passive Ca^{2+} permeability at 320 μM of D-600 is a decrement in the activation energy, E_A , of the Ca^{2+} -uptake activity (Fig. 5).

Based on the observations described in this paper, we propose that the effect of <80 μM D-600 on skeletal muscle fiber contractility can be explained by a direct interaction with the LSR Ca^{2+} -ATPase, specifically with the transmembrane Ca^{2+} -binding domain. This is in agreement with the fact that D-600, similar to other Ca^{2+} channel blockers, is hydrophobic and capable of being incorporated into the membrane matrix (15). Our results, however, cannot distinguish whether D-600 binds to the transmembrane helices of the ATPase or disrupts the lipid bilayer neighboring the transmembrane domain, subsequently interfering with Ca^{2+} translocation. Our results also show that D-600, at concentrations up to 160 μM , does not have any effect on SR Ca^{2+} leakage. This strongly suggests that D-600 does not affect the lipid bilayer of the SR membrane, but rather affects the area closely associated with the transmembrane domain.

We cannot exclude the possibility that, in addition to its effect on Ca^{2+} -uptake inhibition (22), D-600 may also inhibit the T-tubular membrane voltage sensor with a mechanism similar to that described for Ca^{2+}

channel blockage in single dialyzed heart cells (17). Thus the effect of D-600 in skeletal muscle appears to be complex. In addition to its Ca^{2+} channel-blocking effect, which has been shown to play no role in excitation-contraction coupling (2, 13), D-600 also inhibits the SR Ca^{2+} transport system. The inhibition of the Ca^{2+} -ATPase by D-600 could by itself explain the effects of this drug on the excitation-contraction coupling mechanism.

We gratefully acknowledge Miriam Gitler of NOVA Research for the review of this manuscript and her comments.

This work was supported by Grant DGAPA IN218397, Universidad Nacional Autónoma de México, México (A. Ortega), by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (J. R. Lepock), and by National Institute of Neurological Disorders and Stroke Grant R01-NS-17098 (H. Gonzalez-Serratos).

REFERENCES

1. Almers W, Fuik R, and Palade PT. Calcium depletion in frog muscle tubules: the decline of muscle current under maintained depolarization. *J Physiol (Lond)* 312: 177-207, 1981.
2. Berwe D, Gottschalk G, and Luttgau CH. Effects of the calcium antagonist gallopamil (D600) upon excitation-contraction coupling in toe muscle fibers of the frog. *J Physiol (Lond)* 385: 693-707, 1987.
3. Cheng KH and Lepock JR. Inactivation of Ca^{2+} uptake in EGTA is due to an irreversible thermotropic conformational change in the Ca^{2+} binding domain of the Ca^{2+} -ATPase. *Biochemistry* 31: 4074-4080, 1992.
4. Chiesi M and Martonosi A. Calcium transport in sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from rabbit skeletal muscle. In: *Membrane Biochemistry*, edited by Carafoli E and Semenza G. New York: Springer-Verlag, 1989, p. 51-61.
5. Colvin RA, Pearson N, Messineo C, and Katz AM. Effects of Ca^{2+} channel blockers on Ca^{2+} transport and Ca^{2+} ATPase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Cardiovasc Pharmacol* 4: 935-941, 1982.
6. Dorrscheidt-Kafer M. The action of D-600 on frog skeletal muscle: facilitation of excitation-contraction coupling. *Pflügers Arch* 369: 259-267, 1977.
7. Drahota Z. Ionic composition of various types of muscle in relation to their functional activity. In: *Membrane Transport and Metabolism*, edited by Kleinzeller A and Kotyk A. New York: Academic, 1961, p. 571-578.
8. Eisenberg RS, McCarthy RT, and Milton RL. Paralysis of frog skeletal muscle fibers by the calcium antagonist D-600. *J Physiol (Lond)* 341: 495-505, 1983.
9. Erdmann R and Luttgau CH. The effect of the phenylalkylamine D888 (devapamil) on force and Ca^{2+} current in isolated frog skeletal muscle fibers. *J Physiol (Lond)* 413: 521-541, 1989.
10. Fill MD and Best PM. Block of contracture in skinned frog skeletal muscle fibers by calcium antagonists. *J Gen Physiol* 93: 429-449, 1989.
11. Galizzi JP, Borsotto M, Fosset BM, and Lazdunski M. Characterization and photoaffinity labeling of receptor sites for the Ca^{2+} channel inhibitors d-cis-diltiazem, (+)-bepiridil, desmethoxyverapamil, and (+)-PN 200-110 in skeletal muscle transverse tubule membranes. *J Biol Chem* 261: 1393-1397, 1987.
12. Gonzalez-Serratos H, Ortega A, Valle-Aguilera R, and Chang R. Effect of organic calcium channel blocker diltiazem on e-c coupling in isolated fibers of frog skeletal muscle and in rabbit isolated SR (Abstract). *Biophys J* 76: 298a, 1999.
13. Gonzalez-Serratos H, Valle-Aguilera R, Lathrop DA, and Garcia MD. Slow inward calcium currents have no obvious role in frog twitch muscle excitation-contraction coupling. *Nature* 298: 292-294, 1982.
14. Gonzalez-Serratos H, Valle-Aguilera R, and Phillips C. Effect of diltiazem on calcium currents and excitation-contraction coupling in frog twitch muscle. In: *Calcium Antagonists Mechanisms of Action on Cardiac Muscle and Vascular Smooth Muscle*, edited by Sperelakis N and Canfield JB. Boston, MA: Nijhoff, 1984, p. 317-325.
15. Hescheler J, Perzer D, Trube D, and Trautwein W. Does the organic calcium channel blocker D-600 act from inside or outside on the cardiac cell membrane? *Pflügers Arch* 393: 287-291, 1982.
16. Lanzetta PA, Alvarez J, Reinach PS, and Oscar A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100: 95-97, 1979.
17. Lee KS and Tsien RW. Mechanism of calcium channel blockage by verapamil, D-600, diltiazem and nitrendipine in single dialyzed heart cells. *Nature* 302: 790-794, 1983.
18. Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen M, Waters B, and Cheng K-H. Thermal denaturation of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29: 681-689, 1990.
19. Marwaha J and Treffers RC. Actions of a Ca antagonist, D-600 on electrical and mechanical properties of frog skeletal muscle. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 4: 145-152, 1980.
20. Nakajima Y and Endo M. Release of calcium induced by "depolarization" of the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nat New Biol* 246: 216-218, 1973.
21. Ortega A. Application of thermal analysis and differential scanning calorimetry on the study of membrane ATPases involved in the excitation contraction coupling (PhD thesis). Waterloo, Canada: Univ. of Waterloo, 1991.
22. Ortega A, Gonzalez-Serratos H, and Lepock J. Effect of organic calcium channel blocker D-600 on sarcoplasmic reticulum calcium uptake in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C310-C317, 1997.
23. Tsou CL. Conformational flexibility of enzyme active sites. *Science* 262: 380-381, 1993.
24. Wang T, Tsai L-I, and Schwartz A. Effects of verapamil, diltiazem, nisoldipine and felodipine on sarcoplasmic reticulum. *Eur J Pharmacol* 100: 253-261, 1984.

Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle

Viola Becker,^{1,4} Hugo González-Serratos,² Rocío Álvarez,¹
Michael Bäermann,³ Claudine Irles,⁴ and Alicia Ortega^{1,4}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City 04510, México;

²Department of Physiology, School of Medicine, University of Maryland, Baltimore, Maryland 21201; ³Department of Physics E22 (Biophysics), Technical University of Munich, 80333 Garching, Germany; and

⁴Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Perinatología, México City 11000, México

Submitted 25 August 2003; accepted in final form 10 March 2004

Becker, Viola, Hugo González-Serratos, Rocío Álvarez, Michael Bäermann, Claudine Irles, and Alicia Ortega. Effect of endurance exercise on the Ca^{2+} pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *J Appl Physiol* 97: 467–474, 2004. First published April 2, 2004; 10.1152/jappphysiol.00906.2003.—The sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} pump is the main homeostatic regulatory mechanism in fast skeletal muscle that maintains intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) at the nanomolar level at rest. The transverse tubule (TT) Ca^{2+} pump transports cytosolic Ca^{2+} to the extracellular space. During prolonged muscular activity, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may increase. TT and SR isolated microsomal vesicles were highly purified, and the purity was checked by immunoblotting. The present study shows the effects of endurance exercise on the activities and structures of the TT and SR Ca^{2+} pumps of fast skeletal muscle from rabbit at rest. The Ca^{2+} pump activity increased manifolds in TT but did not change in SR. The protein denaturation profiles obtained by differential scanning calorimetry showed 1) a shift in the transition temperature and an increase in the enthalpy of the TT Ca^{2+} pump and 2) a significant change in the transition temperature of the SR Ca^{2+} pump Ca^{2+} -binding domain. We conclude that the TT Ca^{2+} pump activity was upgraded in association with structural changes to handle the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and TT lumen Ca^{2+} concentration that occur during endurance exercise.

muscle adaptation; exercise training

ONE OF THE IMPORTANT LINKS in the chain of events that couples excitation with contraction in skeletal muscle during muscle activation is the Ca^{2+} release from the terminal cisternae of the sarcoplasmic reticulum (SR). This Ca^{2+} release produces an increase in the free intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) to the micromolar level, which, in turn, produces actomyosin interaction and contraction. Afterward, the reuptake of Ca^{2+} by the SR Ca^{2+} pump lowers $[\text{Ca}^{2+}]_i$ to a resting level of 1×10^{-7} M, producing relaxation. It has been shown that there is a continuous and significant entry of Ca^{2+} into skeletal muscle cells at rest (10) and during mechanical activation (17). The SR has a limited capacity to store Ca^{2+} ; therefore, once this capacity is reached, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ will increase above the normal resting value of 1×10^{-7} M. Consequently, during prolonged muscular activity, a long-term increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ content would seriously impair the function of skeletal muscle and lead to proteolysis and cell damage (13, 14). Therefore, during exercise, resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may increase for prolonged periods of

time and may lead to cell damage, unless this long-term increase in resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is lowered shortly after exercise starts. There are several possible homeostatic membrane mechanisms to buffer the extra Ca^{2+} that moves into the muscle cells during prolonged activity: Two, calreticulin (1) and calsequestrin (31, 38), are located in the SR intravesicular space; in the SR membrane is the ATP-dependent Ca^{2+} pump (SERCA). The other Ca^{2+} -lowering mechanisms are located in the plasma membrane. Although the SR has the capability of removing cytosolic Ca^{2+} at a high rate (29) and is highly developed in phasic skeletal muscle cells, it has a limited capacity of storing Ca^{2+} (43). A third mechanism located in the plasma and transverse tubular system (TT) membranes is the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger driven by the Na^+ electrochemical gradient. When the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger operates in the forward mode, as it does under normal circumstances, it extrudes cytosolic Ca^{2+} (5, 21). A fourth mechanism is the calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump located in sarcolemma and in the TT membranes (7, 40). This pump has a low activity (7, 26), with the maximum rate of Ca^{2+} efflux lower than the maximum rate of Ca^{2+} efflux of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in fast skeletal muscle (12). The last two mechanisms mentioned are located in the TT membranes and, thereby, are able to transport from the cytosol to the lumen of the TT Ca^{2+} that subsequently moves to the extracellular space. Other Ca^{2+} regulatory mechanisms that could play an adaptive role during prolonged muscular activity are the TT morphological changes that have been described to occur during chronic low-frequency muscle (through the nerves) stimulation (15, 16).

Different forms of exercise such as “high-repetition, low-load” (endurance) exercise and “low-repetition, high-load” (strength or resistance) exercise induce specific and distinct structural and functional modifications in muscle fibers. Classical endurance exercise interventions of 6- to 8-wk duration in previously untrained subjects lead to an increase of mitochondria density (28). Endurance exercise influences gene expression in skeletal muscle either by the regulatory genes within a period of 30 min to some hours or through the structural genes as a consequence of weeks of systematic training (6, 32). In response to strength training of similar duration, fiber volume and muscle mass increase (35). These training responses involve changes in gene expression. The set of expressed mRNAs provides basic instruction for the diversity of trans-

Address for reprint requests and other correspondence: A. Ortega, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City AP 70-159, CP 04510 (E-mail: aortega@servidor.unam.mx).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

lated proteins that is finally manifested as a characteristic structural adaptation to exercise training.

In general, endurance-exercised individuals are less predisposed to suffer muscle cell damage after prolonged muscle activity (14). The physiological compensatory response to endurance exercise, known as adaptation, may be among other factors the consequence of a prolonged enhancement of one of the Ca^{2+} homeostatic regulatory mechanisms. Thereby it will maintain resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at or below 1×10^{-7} M. If the SR Ca^{2+} pump is enhanced during adaptation, more Ca^{2+} would be transported into the SR; however, the pump's capacity would be reached and resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ would be increased. Bezanilla et al. (3) have shown that during repetitive tetanic activation the TT lumen Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_T$) decreases, whereas the intracellular Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_i$) increases as Na^+ moves in during each action potential. These changes in Na^+ concentration decrease the Na^+ electrochemical gradient ($\Delta\mu_{\text{Na}}$) and, thereby, the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity, leading to an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Consequently, we propose that endurance exercise will induce a major adaptive response of the muscle cell by upgrading the other Ca^{2+} regulatory mechanism, i.e., the Ca^{2+} pump located in the TT membranes.

In this study, we focus on the fundamental importance of the ATP-dependent Ca^{2+} transport in the TT membrane of fast-twitch skeletal muscle composed predominantly of type II muscle fibers. We propose that the activation of the Ca^{2+} transport from the cytosol to the lumen of the TT, as a result of endurance exercise, occurs to protect the cell from Ca^{2+} overload and probably delays the state of fatigue.

METHODS

Animals. New Zealand male rabbits were exercised on a treadmill. Control animals of the same age and litter were kept in their cages without any particular type of exercise during the 8 wk of the exercise program of the experimental group. Both groups of animals received the same diet and water supply. After the endurance exercise protocol was completed, control and endurance-exercised rabbits were sedated with chloroform and killed by quick cervical dislocation. This work was approved by the Universidad Nacional Autonoma de Mexico review board.

Endurance exercise protocol. The protocol consisted of a 4-min warming-up period at a velocity of 11 m/min, followed by a 26-min continuous exercise period divided into four intervals: 6 min at a velocity of 16 m/min, 10 min at a velocity of 27 m/min, 6 min at a velocity 16 m/min, and ending with a 4-min period at 11 m/min to cool down the animals. The total exercise time was 30 min. This exercise session was held once a day for 5 days/wk throughout 8 consecutive weeks. The rabbits were killed as described above 2 days after the last exercise session. The white, predominantly type II fast twitch skeletal muscles from the thigh (vastus lateralis and semitendinosus) were dissected for SR and TT membrane isolation.

Preparation of membrane vesicles. Both thighs of each control or trained animal were used for each membrane isolation. TT and SR microsomes were obtained by differential centrifugation as previously described by Roseblatt et al. (41) and placed on a discontinuous sucrose gradient of 25, 27.5, 30, and 35% wt/vol. The membranes isolated from the sucrose gradient at the 25–27.5% interphase were characterized as TT membranes on the basis of SDS-PAGE, maximum specific dihydropyridine (DHP) binding, and Mg^{2+} -ATPase activity. The 35% band was placed on a second discontinuous gradient consisting of 27.5, 30, and 35% sucrose. The band obtained at the 30–35% interface was identified as light SR, detected by the maxi-

mum ATPase activity stimulated by Ca^{2+} and based on SDS-PAGE electrophoresis (41). The purity of TT and SR membrane vesicles was assessed as described below and in RESULTS. Protein concentration was determined by using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL) with BSA as the standard.

Immunoblotting. Equal amounts of TT and SR membrane protein, determined by Bradford assay (Pierce), were separated by an 8% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose Hybond membrane (Amersham, Little Chalfont, UK). The DHP receptor (DHP) was targeted by using 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sheep anti-DHP antibody (UBI, Lake Placid, NY) in phosphate-buffered saline solution with 0.5% Tween 20 and 3% nonfat milk and a horseradish peroxidase-labeled anti-sheep IgG secondary antibody 0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma, Steinheim, Germany). Chemiluminescence was detected by using X-Omat Blue (Kodak Eastman, Rochester, NY) according to the manufacturer's instruction.

An anti-SERCA1 antibody targeted the SERCA1 membrane enzyme. Blotting was performed with the use of 0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein mouse anti-SERCA1 monoclonal antibody Ab A52 (46) (kindly supplied by Professor D. MacLennan, University of Toronto, Toronto, ON, Canada) using 0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of horseradish peroxidase-labeled anti-mouse IgG secondary antibody.

Ca^{2+} uptake. Ca^{2+} transport was measured at room temperature (22–25°C) by the filtration method in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 1 μCi $^{45}\text{CaCl}_2$, 20 Tris-malate (pH 7.0), and 4 ATP with 0.05 mg of protein/ml. The reaction was stopped with 0.5 ml of ice-cold quenching solution containing (in mM) 5 MgCl_2 , 4 EGTA, and 20 Tris-malate (pH 7.0). Membrane vesicles were filtered through 0.45- μm Millipore filters, washed, dried, and then counted by scintillation.

High-affinity [^3H]PN200–110 binding. Specific binding of DHP was determined by the filtration method using [^3H]PN200–110 as previously described by Hamilton et al. (24). TT membrane aliquots of 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were incubated for 3 h in the dark at room temperature in a solution containing 50 mM MOPS (pH 7.4) and [^3H]PN200–110 (86 Ci/mmol). Nonspecific binding was determined in the presence of 0.001 nifedipine. Samples were filtered and washed with 25 ml of ice-cold deionized water by using 0.45- μm Millipore filters. Filters were dried and radiation was counted with a scintillation counter. Specific binding was calculated as the difference of total and nonspecific binding.

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities. Total ATPase activity and specific Ca^{2+} -ATPase activity were measured by colorimetric determination of P_i using malachite green. Aliquots of 0.005 mg/ml of protein were incubated in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 5 NaN_3 , 20 Tris-malate, and 0.33 ATP, pH 7.0 (30). The reaction was stopped with a solution containing 0.045% malachite green hydrochloride, 4.2% ammonium molybdate in 4 N HCl, 0.8 ml Triton X-100 for each 100 ml of solutions, and 0.25 ml of 34% sodium citrate; absorbance was read at 660 nm. The $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity was measured in the presence of 1 mM EGTA, and the total ATPase activity was measured in the presence of 0.1 mM CaCl_2 . The $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity was calculated as the difference between the total and the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity.

Differential scanning calorimetry. Important information concerning the structure of membrane proteins can be obtained by determining the changes in the specific heat of denaturation (C_p) as a continuous function of increasing temperature at a constant rate by using a differential scanning microcalorimeter MicroCal VP-DSC. The transition temperatures (T_m) of the TT and SR membrane proteins were obtained from the resulting endothermic transition. Both membrane systems were suspended in a buffer containing (in mM) 100 KCl and 20 Tris-malate (pH 7.0). Differential scanning calorimetry (DSC) profiles of C_p vs. temperature were obtained. The membrane sample and reference solution were degassed under vacuum for 5 min before loading the DSC cells (0.6 ml). When equilibrium at 10°C was reached, the temperature was increased to 100°C. The scan rate for all

scans was $1^{\circ}C/min$. To assess for protein denaturation reversibility, the temperature was cooled back to $10^{\circ}C$ and a rescan up to $100^{\circ}C$ was obtained. The baseline was corrected by subtracting the rescan measurement from the scan, which showed in all cases no evidence of reversibility. The T_m was defined as the temperature at which half of the protein is denatured. DSC profiles were deconvoluted, and the best theoretical fit was calculated by assuming there was irreversible denaturation as previously described for SR (33) and for TT membranes (40).

All values are expressed as means \pm SE. All figures are represented as normalized values taking 1 as the maximum activity of the control experiments.

RESULTS

Assessment of the purity of isolated TT and SR microsomal vesicles. Isolated TT membranes from control and adapted muscles were highly purified as described in METHODS. Specific ryanodine binding was not detected in any of the isolated TT membranes, indicating that the membranes were not contaminated with SR terminal cisternae vesicles. The specific DHP binding, determined to test the enrichment of TT, was 9.3 ± 2.7 and 11.2 ± 4.3 pmol/mg protein, respectively, from muscles of control ($n = 3$) and endurance-exercised rabbits ($n = 3$).

To further assess the purity of the isolated vesicles of TT and SR, specific immunoblotting was performed as described in METHODS by using antibody protein binding. Figure 1 shows immunoblotting results against DHPR (Fig. 1A) and against SERCA1 (Fig. 1B) in membrane fractions obtained by differential centrifugation. The membrane fraction obtained at the interface 25/27.5%, contains a protein at 170 kDa, which reacts with the anti-DHPR antibody and corresponds to the α_1 -subunit of the DHPR. In the fraction obtained at the 30/35% interface, which has been shown to correspond to SR, where the highest SERCA activity is observed, the anti-DHPR antibody did not detect DHPR. This membrane fraction was further used to isolate light SR as described in METHODS. Figure 1B shows the Western blot analysis in the 25/27.5% and 30/35% membrane fractions against SERCA1. The membrane fraction obtained at the interface 30/35% contains a protein around 115 kDa that reacts with the anti-SERCA1 antibody, which therefore we are led to conclude corresponds to SERCA1. However, in the fraction obtained at the interface 25/27.5% (TT membrane), there was no activity. On the basis of the above, the fraction isolated at the interface 25/27.5%, which was previously characterized as TT membranes (41), was used for the present study.

ATPase activity and ATP-dependent Ca^{2+} transport. The TT ATP-dependent Ca^{2+} transport was notably affected in muscles from endurance-exercised rabbits compared with muscles from control animals. Fig. 2A shows that, at the end of the 30-min reaction, the normalized TT ATP-dependent Ca^{2+} transport from endurance-exercised muscles increased 2.8-fold compared with the control reaction. The Ca^{2+} transport at 30 min increased from 58.6 ± 3.8 to 161.20 ± 11.0 nmol/mg protein ($n = 4$). Figure 2B shows the normalized SR Ca^{2+} transport, which, up to 15 min, is practically the same for preparations from control and endurance-exercise animals. At the end of 30 min, the reaction from endurance-exercised preparations decreased by 13% compared with controls. The specific activities measured 30 min after the beginning of the

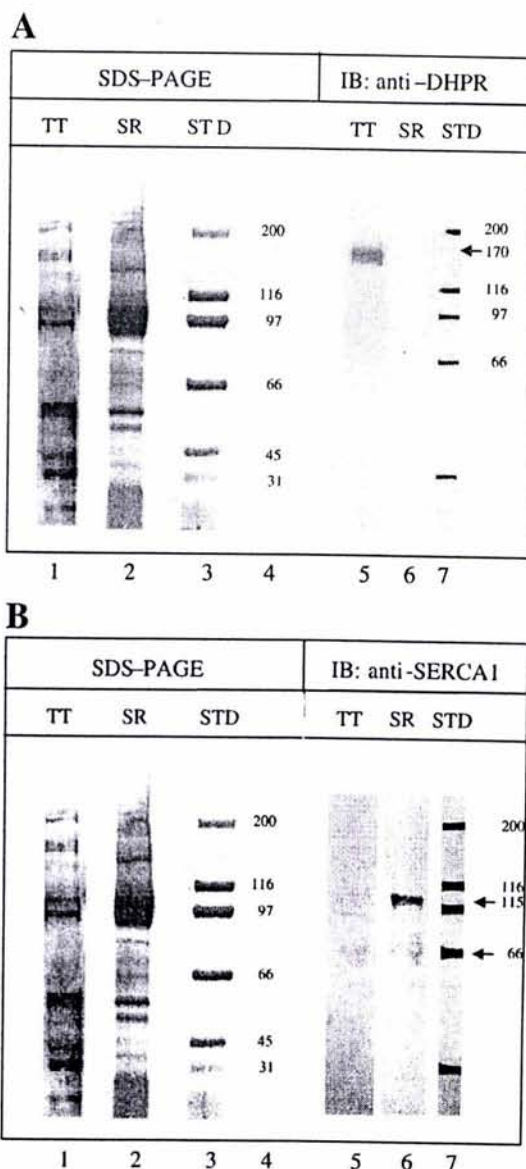


Fig. 1. Immunolabeling of dihydropyridine receptor (DHPR) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) in different fractions of muscle microsomes after a sucrose gradient separation. Membrane fractions obtained after sucrose-density gradient centrifugation, collected at the interfaces 25/27.5% and 30/35% as described in METHODS and resuspended in 10% sucrose, 20 mM Tris-malate pH 7.0. **A**: equal amounts of membrane protein (5 μ g per lane) of the membrane fraction at the 25/27.5% and 30/35% interface were separated on SDS-PAGE 8% (wt/vol) and silver stained (lanes 1 and 2). Molecular mass markers are indicated for the SDS-PAGE in lanes 3 and 4. Proteins were then transferred onto nitrocellulose. The corresponding Western blots stained with antibodies to the DHPR are shown in lanes 5 and 6 for membrane fraction obtained at the interfaces 25/27.5% and 30/35%, respectively. Arrows in lane 7 indicate the molecular mass markers of individual proteins in the immunoblot. TT, transverse tubule; SR, sarcoplasmic reticulum; STD, protein standard; IB, immunoblot. **B**: equal amounts of membrane protein (5 μ g per lane) of the membrane fraction at the 25/27.5 and 30/35% interfaces were separated on SDS-PAGE 8% (wt/vol) and silver stained in lanes 1 and 2. Molecular weight markers are indicated for the SDS-PAGE in lane 3 and 4. Proteins were then transferred onto nitrocellulose. Lanes 5 and 6 show the corresponding Western blots stained with antibodies to SERCA1 in lanes 5 and 6 for membrane fractions 25/27.5 and 30/35%, respectively. Arrows in lane 7 indicate the molecular mass markers of individual proteins in the immunoblot.

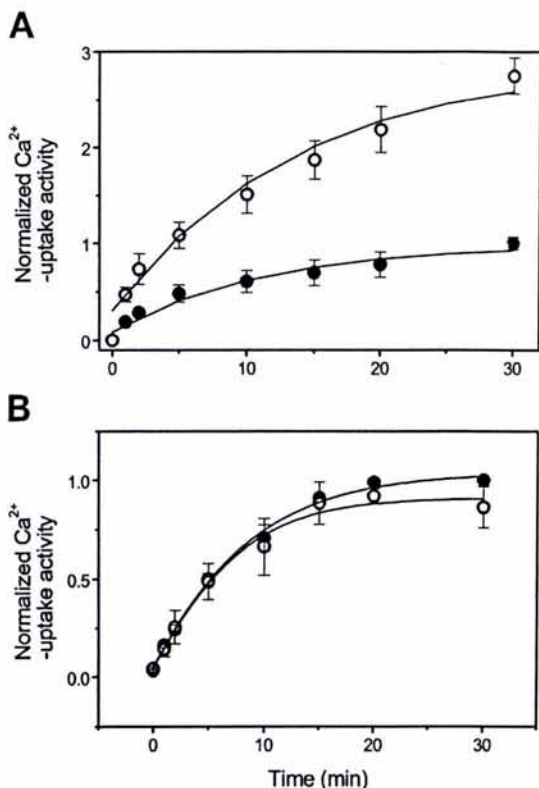


Fig. 2. Effect of endurance exercise training on ATP-dependent Ca^{2+} transport in TT vesicles (A) and light SR vesicles (B). ●, ○, Experiments performed with vesicles isolated from control and endurance-exercised animals, respectively. Ca^{2+} transport from 0.1 mg/ml vesicles was measured in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 1 μM Ci/ml $^{45}\text{CaCl}_2$, 4 ATP, 20 Tris-malate (pH 7.0). ATP-dependent Ca^{2+} transport was normalized to the maximum transport activity for TT and SR measured 30 min after the beginning of the reaction from muscle of control and exercised animals. Continuous line, best fitting to the experimental points.

reaction were 300 ± 2 ($n = 4$) and 260 ± 3 nmol/mg protein for control and endurance-exercised muscles, respectively.

The TT Ca^{2+} pump hydrolytic activity, measured 30 min after the reaction started, increased from 0.7 ± 0.027 $\mu\text{mol/mg}$ in TT vesicles obtained from untrained animals to 1.3 ± 0.28 $\mu\text{mol/mg}$ ($n = 4$) in TT vesicles obtained from endurance-exercised rabbits. This corresponds to a 1.8-fold increase (Fig. 3A). The Mg^{2+} -ATPase activity, which is the most abundant protein and ATPase activity in TT membranes, increased from 2.9 ± 0.4 to 9.3 ± 1.4 $\mu\text{mol/mg}$ protein in endurance-exercised animals. This corresponds to a 3.2-fold increase with respect to the control (Fig. 3B). No important changes in Ca^{2+} pump activity were observed in SR as a consequence of adaptation to exercise (Fig. 3C). The SR Ca^{2+} pump hydrolytic activity was 13.5 ± 0.8 and 14.2 ± 3 $\mu\text{mol/mg}$ protein measured 30 min after the reaction started, for control and adapted animals, respectively.

Differential scanning calorimetry. To investigate whether endurance exercise induced conformational changes in TT and SR membrane proteins, we studied by DSC the denaturation profile of membranes from control and endurance-exercised rabbit muscles. In our studies, isolated TT and SR membranes showed important changes in the protein denaturation profile after adaptation to exercise. In all experiments, denaturation

was completely irreversible after the temperature reached 100°C . The T_m and enthalpy (heat of transition) of Ca^{2+} pumps indicate that the native structure of the proteins had changed.

The thermal denaturation profiles of isolated TT membranes obtained from a heating rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ are shown in Fig. 4A for membranes obtained from control and in Fig. 4B for membranes obtained from endurance-exercised rabbits.

We observed three major transitions. These transitions are the same as those previously described by Ortega and Lepock (40), who attributed *transition A* to the Ca^{2+} pump and *transition B* to the Mg^{2+} -ATPase. *Transition C* was found to correlate with the denaturation of the DHP receptor components (data not shown). The T_m and enthalpy computed from the DSC profiles shown in Fig. 3B indicate important changes in all three transitions (A, B, and C), in membranes isolated from muscles of endurance-exercised animals. However, the

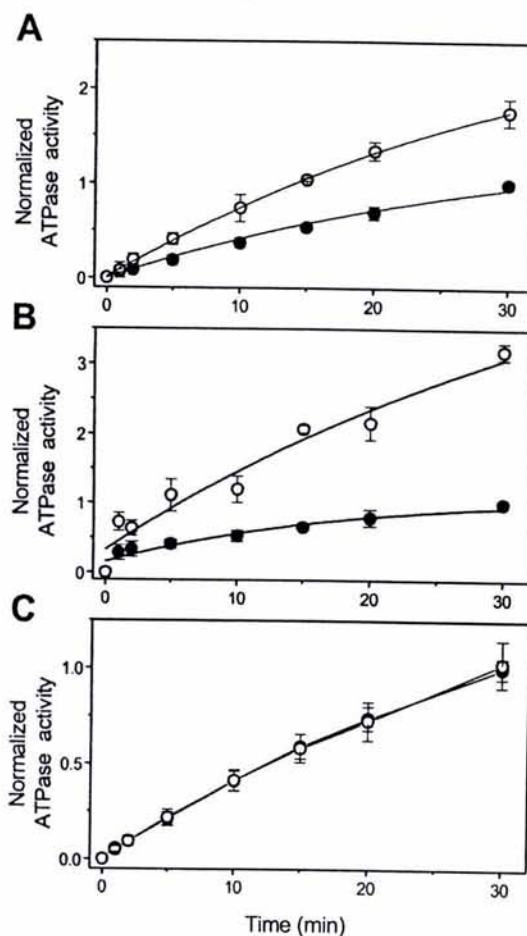


Fig. 3. Effect of endurance-exercise training on the Ca^{2+} pump hydrolytic activity of isolated TT vesicles (A), the Mg^{2+} -ATPase activity of TT vesicles (B), and the Ca^{2+} pump hydrolytic activity of isolated SR vesicles (C) as a function of time. ●, ○, Experiments performed with vesicles isolated from control and endurance-exercised animals, respectively. Ca^{2+} pump activities were measured from 0.006 mg/ml in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 5 NaN_3 , 0.33 ATP, and 20 Tris-malate (pH 7.0). The Mg^{2+} -ATPase activity was measured in the same solution but with CaCl_2 replaced with 1 mM EGTA. The ATPase activities were normalized to the maximum activity measured 30 min after the beginning of the reaction from the muscle of control animals. Continuous line, best fitting to the experimental points.

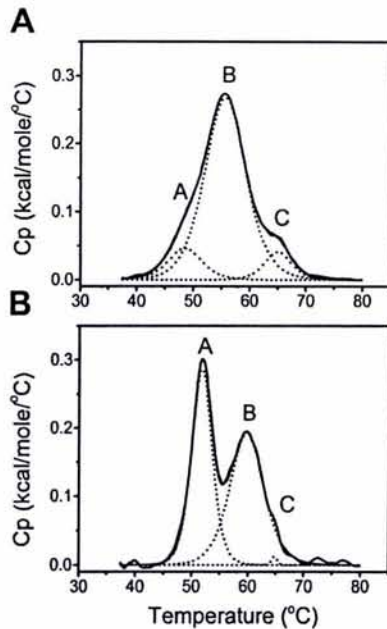


Fig. 4. Differential scanning calorimetric profiles [excess specific heat of denaturation (C_p) vs. temperature] of TT membranes isolated from muscles of control animals (A) and TT membranes isolated from muscles of endurance-exercised animals (B). TT membranes (1–1.5 mg/ml) were heated at an increasing rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ in a solution containing 10% sucrose, 1 mM DTT, and 20 mM Tris-malate (pH 7.0). Solid line represents the experimental data; dotted line indicates the best theoretical fit. Peaks A, B, and C are labeled (see text for explanation).

most dramatic changes are observed in transitions A and C. Transition A yields a 2.5-fold increment in enthalpy from 367 ± 45 to 919 ± 102 kJ/mol ($n = 3$) and a shift in T_m of 3°C from 49 ± 0.4 to $52 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ($n = 3$), indicating that an important conformational change had occurred in the Ca^{2+} pump. Transition B shows a shift in the T_m from 56 ± 1 to $60 \pm 1^\circ\text{C}$ ($n = 3$) and a decrease in enthalpy of 60%, from $2,570 \pm 112$ ($n = 3$) to $1,030 \pm 98$ kJ/mol ($n = 3$). The heat of transition associated with component C decreased $\sim 50\%$; it appears as a single, broad component with the same T_m at 65°C in both conditions.

The denaturation profile of isolated light SR shows mainly the denaturation of the Ca^{2+} pump. The protein electrophoretic pattern of light SR used in these experiments reveals an 80–95% composition of Ca^{2+} pump. Lepock et al. (33) demonstrated that, in the presence of 1 mM CaCl_2 , two different transitions, A and B, appear in the DSC. Transition A corresponded to the denaturation of the nucleotide binding domain, and transition B corresponds to the denaturation of the transmembrane Ca^{2+} -binding domain. Figure 5 shows the DSC profile of SR membranes isolated from muscles of control (A) and endurance-exercised (B) rabbits. A conformational change was detected in the Ca^{2+} -binding domain (transition B), mainly as a shift in the T_m from 63 to $59 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ($n = 3$). The transition associated with the nucleotide-binding domain (transition A) has the same T_m at 51°C in both conditions.

DISCUSSION

Muscle is a very adaptable tissue with an intrinsic ability to change its mass and phenotype in response to activity. Adap-

tation to different muscle work regimes is brought up by changes in fiber type and cross-sectional area. Endurance exercise or intermittent daily muscle nerve stimulation leads to adaptive phasic skeletal muscle responses consisting in a reduction in the number of type IIB fibers as they get transformed into IIA fibers (36). It has been widely documented that both mass and phenotype are markedly altered by strength training within a short period of time (35). Prolonged exercise has been associated with quantitative as well as qualitative changes in gene expression for contractile proteins (18, 19) and compensatory biochemical changes (27). Other types of adaptive response studied in the context of endurance exercise or chronic electrical stimulation experiments are changes in Ca^{2+} regulatory proteins. Such adaptive changes have been observed in the SR Ca^{2+} pump (23), parvalbumin (23, 31), and calsequestrin (31, 38), the major SR Ca^{2+} binding protein (37).

The results described in this paper show that the TT and SR Ca^{2+} pumps of animals that have been subjected to 8 wk of endurance exercise exhibit the following characteristics compared with nontrained animals: 1) a considerable increase in Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} pump hydrolytic activity in vesicles of TT membranes; 2) an important increase in Mg^{2+} -ATPase activity in TT; 3) no considerable differences in Ca^{2+} transport and Ca^{2+} pump hydrolytic activity in light SR vesicles compared with controls; 4) a considerable change in thermal stability and enthalpy as the result of the denaturation of the TT Ca^{2+} pump and Mg^{2+} -ATPase in the adapted muscles; and 5) a modification in thermal stability and enthalpy of the SR Ca^{2+} pump caused by changes in the Ca^{2+} -binding domain, although the function of the SR Ca^{2+} pump was not modified.

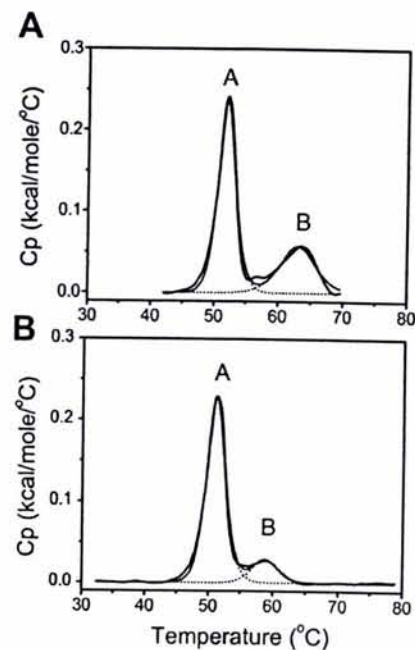


Fig. 5. Differential scanning calorimetric profiles (excess C_p vs. temperature) of light SR (LSR; A) isolated from control animals and LSR membranes isolated from endurance-exercised animals (B). LSR membranes (1–1.5 mg/ml) were scanned with temperature increasing at a rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ in a solution containing 10% sucrose, 1 mM DTT, 20 mM Tris-malate, and 1 mM CaCl_2 , pH 7.0. Solid line represents the experimental data, and the best theoretical fit is represented by the dotted line. Peak A is the nucleotide-binding domain, and peak B is the Ca^{2+} -binding domain.

Our results lead us to conclude that one of the most important adaptive changes in endurance exercise involves the upgrading of the TT Ca^{2+} pump. To our knowledge, this is the first study that shows the effect of endurance exercise on the TT ATP-dependent Ca^{2+} uptake and the TT Ca^{2+} pump hydrolytic activity. These two processes result in a 2.8- and 1.8-fold increased activity, respectively. Specific binding of [^3H]RyR and [^3H]DHPR and immunoblot studies show the enriched concentration of DHPR in the fraction associated with TT and the absence of SERCA1 antibody immunolabeling, indicating the purity of the fraction used in the present study.

The adaptive modifications previously described by other researchers indicate, in general, that sustained contractile activity during prolonged time periods leads to modifications in the cytosolic Ca^{2+} regulatory proteins. Chronic electrical stimulation of fast-twitch rabbit muscle nerves using a frequency pattern typical of slow-twitch muscles induces progressive transformations of structural, functional, and molecular characteristics of the SR. These experiments indicated that after 2 days of stimulation the SR Ca^{2+} pump SERCA1 isoform, which is mainly expressed in fast-twitch type II fibers, is converted to the SERCA2 isoform, mainly expressed in slow-twitch type I fibers (8, 23, 25, 34, 36). Under these conditions, the ATPase hydrolytic activity and the corresponding Ca^{2+} transport associated with the ATPase activity show a decrease (22). Mabuchi et al. (36) have shown that long-term intermittent stimulation (10 Hz, 8 h/day for 7 wk) of the fast-twitch tibialis cranialis muscle results in a complete transformation of type IIB fibers to type IIA fibers with a decrease in the SR Ca^{2+} transport activity. These adaptive changes are consistent with the characteristics that correspond to slower [Ca^{2+}]_i buffering systems. Therefore, these fibers would not be very efficient in handling a continuous long-term Ca^{2+} entry that may take place during many days of exercise. All of these studies underline the importance of the stimulation protocol parameters in determining under what condition a fast-to-slow transformation of fiber type could take place as a consequence of endurance exercise. Also, single bouts of intense exercise may lead to a modified Ca^{2+} handling, similar to the alterations found by repetitive prolonged mechanical activation leading to fatigue. Under these conditions of stimulation, relaxation slows down to a point that a sustained contracture can arise, suggesting that a low-level increase in cytosolic [Ca^{2+}] is maintained for a long period of time (20). This extra cytosolic Ca^{2+} may be the consequence of a decrease in the rate of Ca^{2+} transport by the SR, because it occurs in animals that exercise without having gone through previous endurance exercise (2, 22, 44). Thus the intracellular Ca^{2+} buffering mechanisms become overwhelmed, and the extra Ca^{2+} is extruded through the sarcolemmal and TT Ca^{2+} pumps to the extracellular space, thereby increasing the TT lumen [Ca^{2+}] (4). However, under normal conditions and before adaptive changes take place, also the TT Ca^{2+} pumps have a limited capacity and they cannot extrude the cytosolic Ca^{2+} that builds up during prolonged exercise.

We found that after 8 wk of endurance exercise, the Ca^{2+} pump from light SR had experienced a conformational change in the transmembrane Ca^{2+} -binding domain as indicated by a change in the thermal stability of *transition B* in the DSC experiments. Ortega and Lepock (40) and Siniestra et al. (42) have previously associated a conformational change of the SR

transmembrane Ca^{2+} -binding domain of the Ca^{2+} pump with a decrease in the activity of Ca^{2+} transport. However, we did not find substantial differences in Ca^{2+} transport and pump hydrolytic activity associated to the conformational change. This is in agreement with Green et al. (22), who found that SR Ca^{2+} -ATPase activity, which reflects SR Ca^{2+} uptake, decreases by 31% after 60 min of exercise before training, but that, after 12 wk of exercise training the ATPase activity was unchanged. Wilson et al. (44) studied the rate of Ca^{2+} uptake and SR Ca^{2+} pump hydrolytic activity in SR vesicles isolated from the middle gluteal muscle of the horse, before the last exercise session after 12 wk of training. However, these authors found that there was a 17% and a 62% increase in the rate of Ca^{2+} uptake and SR Ca^{2+} pump hydrolytic activity, respectively. They also observed 31 and 76% improvements in the postexercise decreased rate of Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} pump hydrolytic activity. The difference between the results of Wilson et al. and our results could be attributed to the use of different animal species and muscles or to contamination by TT membranes in the isolated SR vesicles. Wilson and collaborators did not discriminate between having isolated pure light SR and TT membranes as separated or attached vesicles. It is not uncommon that during the isolation process SR vesicles remain attached to TT vesicles, especially if a microsomal fraction is used (41).

Our results show a small change in the SR ATP-dependent Ca^{2+} transport and no change in ATPase hydrolytic activity measured at rest after endurance exercise. Thus the underlying conformational change described in this paper may well be associated with a change in the activity of the SR Ca^{2+} pump that we have observed. The mechanism by which a modified conformation of the SR Ca^{2+} -ATPase does not reveal a change in activity is yet unknown and is under investigation in our laboratory.

Another homeostatic mechanism that could extrude the extra cytosolic Ca^{2+} that might be accumulated during prolonged periods of muscle activity is the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger located in the plasma membrane (12) when operating in the forward mode (5, 21). The exchanger is driven by the $\Delta\mu_{\text{Na}}$. However, at the normal [Na^+]_T of 120 mM, [Na^+]_T is reduced to ~60 mM during a 60-Hz, 2- to 3-s tetanus (3). The other 60 mM move into the cytosol, increasing [Na^+]_i. The [Na^+]_T depletion and [Na^+]_i increase cause a substantial decrease in $\Delta\mu_{\text{Na}}$. The decreases in $\Delta\mu_{\text{Na}}$ and in resting membrane potential that occur during high-frequency activation (3) lead to low activity of the exchanger, resulting in an increased cytosolic [Ca^{2+}]. The SR may take up the extra Ca^{2+} not extruded by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. However, the frequency of stimulation does not allow for a complete Ca^{2+} removal by the SR as the rate of Ca^{2+} uptake decreases (43). These combined factors will lead to an increase in cytosolic [Ca^{2+}] (21) that will alter excitation-contraction coupling, contractility, and, subsequently, viability of the muscle cells. Thus another mechanism must be upgraded to reduce the increased long-term cytosolic [Ca^{2+}]_i. The results from our DSC measurements show that the changes in TT Ca^{2+} -ATPase hydrolytic and transport activities are accompanied by conformational changes of the TT membrane proteins. Thereby we propose that endurance exercise upgrades the TT Ca^{2+} pump. This modification leads to an increased TT ATP-dependent Ca^{2+} transport and thus to an increased transfer of Ca^{2+} out of the cell into the TT lumen. The changes described

in the present study cannot be attributed to the morphological changes of the TT system that have been observed during and after chronic low-frequency muscle electric stimulation (15, 16). Chronic low-frequency electric stimulation decreases the TT system density. If this had happened during the long-term exercise, it would have led to a decrease in the density of the TT Ca^{2+} pump and thereby to a decrease, not an increase, in total Ca^{2+} pump activity.

In conclusion, the experiments described in this paper support the idea that two of the most important changes resulting from endurance exercise are the upgrading of the TT Ca^{2+} pump and the Mg^{2+} -ATPase activity. The upgrading of the activity of the Ca^{2+} pump may become one of the homeostatic compensatory mechanisms to handle the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that take place during endurance exercise. Otherwise, during prolonged muscular activity, i.e., endurance exercise, resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ may increase long term. This long-term increase in the cytosolic Ca^{2+} content would seriously impair the function of skeletal muscle. Ca^{2+} is an activator of the protease calpain, which has been found in skeletal muscle (11). Calpains produce proteolysis (13, 45) and also decapitation of dystrophin (9). Therefore, an excessive amount of Ca^{2+} will cause an overproduction of calpains, which may lead through the combination of the above effects to severe muscle damage. Unless this long-term increase in resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is lowered by the upgraded TT Ca^{2+} pump shortly after training starts, it would lead to proteolysis and cell damage (13, 14, 45). The precise nature of the conformational changes described in this paper remains unknown. We are presently investigating the nature of these conformational changes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. David MacLennan from the Charles H. Best Medical Research Institute, University of Toronto, Ontario, Canada who very generously provided us with the SERCA1 antibody and Anne O. Nourse from the University of Maryland for valuable and helpful suggestions in the editing and preparation of the manuscript. We gratefully acknowledge the participation of students Miguel Tapia, Pável Vasquez, Julio Martínez, Alfonso Vallejo, and Cecilia Sánchez from the Universidad Nacional Autónoma de México for participation at different stages of the project.

GRANTS

This work was supported by grants DGAPA-IN218397 and DGAPA-IN207001, Universidad Nacional Autónoma de México, the Alexander von Humboldt Foundation Research Fellowship to A. Ortega, and an Intramural Grant from the University of Maryland School of Medicine to H. Gonzalez-Serratos.

REFERENCES

- Baker HL, Errington RJ, Davies SC, and Campbell AK. A mathematical model predicts that calreticulin interacts with the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biophys J* 82: 582–590, 2002.
- Belcastro AN, Gilchrist JS, and Srubb J. Function of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles with exercise. *J Appl Physiol* 75: 2412–2418, 1993.
- Bezanilla F, Caputo C, and Gonzalez-Serratos H. Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibers of the frog. *J Physiol* 223: 509–523, 1972.
- Bianchi P and Narayan S. Muscle fatigue and the role of transverse tubules. *Science* 215: 295–296, 1982.
- Blaustein MP and Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79: 763–854, 1999.
- Booth FW, Tseng BS, Flück M, and Carson JA. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand* 162: 343–350, 1998.
- Brandt NR, Caswell AH, and Brunschwig JP. ATP-energized Ca^{2+} -pump in isolated transverse tubules of skeletal muscle. *J Biol Chem* 255: 6290–6298, 1980.
- Briggs FN, Lee KF, Feher JJ, Wechsler AS, Ohlendieck K, and Campbell KP. Ca^{2+} -ATPase isozyme expression in sarcoplasmic reticulum is altered by chronic stimulation of skeletal muscle. *FEBS Lett* 259: 269–272, 1990.
- Cottin P, Poussard S, Mornet D, Brustis JJ, Mohammadpour M, Leger J, and Ducasting A. In vitro digestion of dystrophin by calcium-dependent proteases, calpains I and II. *Biochimie* 74: 565–570, 1992.
- Curtis BA. Calcium fluxes in single twitch muscle fibers. *J Gen Physiol* 50: 255–267, 1966.
- Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM, and Reville WJ. A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15: 2150–2158, 1976.
- Donoso P and Hidalgo C. Sodium calcium exchange in transverse tubule isolated from frog muscle. *Biochim Biophys Acta* 978: 8–16, 1989.
- Duncan CJ. Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* 34: 1531, 1978.
- Ebbeling CB and Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. *Sports Med* 7: 207–234, 1989.
- Eisenberg BR, Brown JMC, and Salmons S. Restoration of fast muscle characteristics following cessation of chronic stimulation. The ultra structure of slow-to-fast transformation. *Cell Tissue Res* 238: 221–230, 1984.
- Eisenberg BR and Salmons S. The reorganization of subcellular structures in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. *Cell Tissue Res* 220: 221–230, 1984.
- Gissel H and Clausen T. Excitation-induced Ca^{2+} uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R331–R339, 1999.
- Goldberg AL. Protein synthesis during work-induced growth of skeletal muscle. *J Cell Biol* 36: 653–658, 1968.
- Goldspink G. Selective gene expression during adaptation of muscle in response to different physiological demands. *Comp Biochem Physiol B* 120: 5–15, 1998.
- Gonzalez-Serratos H. Differential shortening of myofibrils during contraction of isolated twitch muscle fibers. *J Physiol* 253: 321–329, 1975.
- Gonzalez-Serratos H, Hilgemann DK, Rozycka M, Gauthier A, and Rasgado-Flores H. Na^+ - Ca^{2+} exchange studies in sarcolemmal skeletal muscle. *Ann NY Acad Sci* 79: C556–C560, 1996.
- Green HJ, Grange F, Chin C, Goreham C, and Ranney D. Exercise-induced decreases in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity attenuated by high-resistance training. *Acta Physiol Scand* 164: 141–146, 1998.
- Green HJ, Klug GA, Reichmann H, Seedorf U, Wieher W, and Pette D. Exercise induced fiber type transitions with regard to myosin, parvalbumin and sarcoplasmic reticulum in muscles of the rat. *Pflügers Arch* 400: 432–438, 1984.
- Hamilton SL, Alvarez RM, Fill M, Hawkes MJ, Brush KL, Schilling WP, and Stefani E. ^3H PN200–110 and ^3H ryanodine binding and reconstitution of ion channel activity with skeletal muscle membranes. *Anal Biochem* 183: 31–41, 1989.
- Heilmann C and Pette D. Molecular transformations in sarcoplasmic reticulum of fast-twitch muscle by electro-stimulation. *Eur J Biochem* 93: 437–446, 1979.
- Hidalgo C, Gonzalez ME, and Garcia AM. Calcium transport in transverse tubules isolated from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 854: 279–286, 1986.
- Holloszy JO and Edward FC. Adaptation to skeletal muscle to endurance-exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 56: 831–838, 1984.
- Hoppeler H, Howald H, Conley K, Lindstedt SI, Claussen H, Vock P, and Weibel ER. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. *J Appl Physiol* 59: 320–327, 1985.
- Inesi G and Hill TL. Calcium and proton dependence of sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biophys J* 44: 271–280, 1983.
- Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, and Candia OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100: 95–97, 1979.
- Leberer E and Pette D. Immunochemical quantification of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, of calsequestrin and of parvalbumin in rabbit skeletal muscles of defined fiber composition. *Eur J Biochem* 156: 489–496, 1986.

32. Leberer E, Seedorf U, and Pette D. Neural control of gene expression in skeletal muscle. Calcium sequestering proteins in developing and chronically stimulated rabbit skeletal muscles. *Biochem J* 239: 295–300, 1986.
33. Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen M, Waters B, and Cheng KH. Thermal denaturation of the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29: 681–689, 1990.
34. Luckin KA, Favero TG, and Klug GA. Prolonged exercise induces structural changes in SR Ca^{2+} -ATPase of rat muscle. *Biochem Med Metab Biol* 46: 391–405, 1991.
35. Luthi JM, Howald H, Claassen H, Rosler K, Vock P, and Hoppeler H. Structural changes in skeletal muscle tissue with heavy-resistance exercise. *Int J Sports Med* 7: 123–127, 1986.
36. Mabuchi K, Szvetko D, Pinter K, and Sreter FA. Type IIB to IIA fiber transformation in intermittently stimulated rabbit muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 242: C373–C381, 1982.
37. MacLennan DH and Wong PTS. Isolation of a calcium sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1231–1235, 1971.
38. Ohlendieck K, Fromming GR, Murray BE, Maguire PB, Leisner E, Traub I, and Pette D. Effects of chronic low-frequency stimulation on Ca^{2+} -regulatory membrane proteins in rabbit fast muscle. *Pflügers Arch* 438: 700–708, 1999.
39. Ortega A, Becker MV, Alvarez R, Lepock JR, and Gonzalez-Serratos H. Interaction of D-600 with the transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C166–C172, 2000.
40. Ortega A and Lepock JR. Use of thermal analysis to distinguish magnesium and calcium stimulated ATPase activity in isolated transverse tubules from skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1233: 7–13, 1995.
41. Roseblatt M, Hidalgo C, Vergara C, and Ikemoto N. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 256: 8140–8148, 1981.
42. Siniestra G, Steven A, Escaravage M, Konjeti R, Sekhar M, Freeman ML, Borrelli M, and Lepock JR. Destabilization of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum by thiol-specific, heat shock inducers results in thermal denaturation at 37°C. *Biochemistry* 36: 11002–11011, 1997.
43. Somlyo AV, McClellan G, Gonzalez-Serratos H, and Somlyo AP. Electron probe X-ray microanalysis of post-tetanic Ca^{2+} and Mg^{2+} movements across the sarcoplasmic reticulum in situ. *J Biol Chem* 260: 6801–6807, 1985.
44. Wilson JA, Kromfeld DS, Gay LS, Williams JH, Wilson TM, and Lindinger MI. Sarcoplasmic reticulum responses to repeated sprints are affected by conditioning of horses. *J Anim Sci* 76: 3065–3071, 1998.
45. Wrogieman K and Pena SDJ. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell necrosis in muscle diseases. *Lancet* 27: 672–673, 1976.
46. Zubrzycka-Gaarn E, MacDonald G, Phillips L, Jørgensen AO, and MacLennan DH. Monoclonal antibodies to the Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum identify polymorphic forms of the enzyme and indicate the presence in the enzyme of a classical high-affinity Ca^{2+} binding site. *J Bioenerg Biomembr* 16: 441–464, 1984.

