



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROPIEDADES BIOFISICAS DE LA CORRIENTE DE  $Ca^{2+}$  TIPO L,  
EN MIOCITOS VENTRICULARES DE RATA ADULTA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

SERVANDO JESUS MORENO SANCHEZ



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAFAEL MEJIA ALVAREZ

2004  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Propiedades biofísicas de la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L, en miocitos ventriculares de rata adulta

realizado por Servando Jesús Moreno Sánchez

con número de cuenta 8659562-3, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Rafael Mejía Álvarez

Propietario Dr. José María Farías Sánchez

Propietario Dra. Margarita Victoria García Garduño

Suplente Biólogo Julio Prieto Sagredo

Suplente Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
SISTEMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE ENSEÑANZA  
EN BIOLOGÍA

**Esta tesis se las dedico a ustedes que son el motor y la razón de mi vida.**

**Doris por tu apoyo incondicional y por todo el amor que me das. En buena parte es tuya.**

**Hijos, Ser y Edi, es el esfuerzo palpable de superación. Siganlo**

**Papá no la viste en persona, pero estoy seguro de que la ves con claridad. Te quiero.**

**Para mis grandes hermanos, como un agradecimiento a todo su apoyo, y ejemplo de tenacidad, honestidad, pero sobretodo de hermandad. Para todos ustedes: Sergio, Pati, Mario, Fabi, Nena y Juan.**

**Rafael, gracias por todo el apoyo que fue invaluable. Amigos.**

**Gracias a mis sinodales: Dr. José María, Dra. Margarita García Garduño, Biól. Julio Prieto y Dra. Elsa Guadalupe Escamilla, gracias por su apoyo y dirección.**

# I N D I C E

1.- RESUMEN	3
2.- INTRODUCCION	5
3.- ANTECEDENTES	10
3.1. <i>Canales Iónicos</i>	10
3.2. <i>Generalidades de los canales de <math>Ca^{2+}</math></i>	11
3.2.1. <i>Clasificación de los canales de <math>Ca^{2+}</math></i>	12
3. <i>Canal de <math>Ca^{2+}</math> tipo-L</i>	13
3.4. <i>Canal de <math>Ca^{2+}</math> tipo-L cardiaco</i>	14
3.4.1. <i>Papel Funcional</i>	14
3.4.2. <i>Localización y Estructura</i>	15
3.4.3. <i>Permeabilidad</i>	16
3.4.4. <i>Bloqueo</i>	18
3.4.5. <i>Cinética</i>	18
3.4.5.1. <i>Activación</i>	19
3.4.5.2. <i>Inactivación</i>	20
3.4.5.3. <i>Modelo de Hodgking y Huxley</i>	20
4.- OBJETIVOS	23
5.- MATERIAL Y METODOS	24
5.1. <i>Aislamiento de los miocitos ventriculares de rata adulta.</i>	24
5.2. <i>Mediciones Electrofisiológicas.</i>	25
5.2.1. <i>Registro del Potencial de Acción.</i>	25
5.2.2. <i>Registro de <math>I_{Ca}</math></i>	25
5.2.3. <i>Medición del Area Celular</i>	27
5.2.4. <i>Determinación de la Dependencia de Voltaje de <math>I_{Ca}</math> en el Estado Estacionario</i>	28
5.2.4.1. <i>Inactivación</i>	29
5.2.4.2. <i>Activación</i>	29
5.2.4.3. <i>Corriente Estacionaria o de Ventana</i>	31

5.3. <i>Análisis de Datos</i>	31
5.4. <i>Soluciones Experimentales</i>	32
6.- RESULTADOS	34
6.1.- <i>CAPITULO I. POTENCIAL DE ACCIÓN</i>	34
6.2.- <i>CAPITULO II. CURSO TEMPORAL DE <math>I_{Ca}</math></i>	36
6.2.1.- <i>Fase de Activación</i>	37
6.2.2.- <i>Fase de Inactivación</i>	39
6.3.- <i>CAPITULO III. PROPIEDADES DE PERMEABILIDAD DE <math>I_{Ca}</math></i>	41
6.3.1.- <i>Amplitud de <math>I_{Ca}</math> en Función del <math>V_m</math></i>	41
6.3.2.- <i>Densidad de <math>I_{Ca}</math></i>	43
6.4.- <i>CAPITULO IV. CINÉTICA DE <math>I_{Ca}</math> EN EL ESTADO ESTACIONARIO</i>	45
6.4.1.- <i>Activación</i>	45
6.4.2.- <i>Inactivación</i>	48
6.4.3.- <i>Corriente de Ventana y su Relación con el     Componente Estacionario de <math>I_{Ca}</math></i>	51
6.5.- <i>CAPITULO V. <math>I_{Ca}</math> DURANTE EL POTENCIAL DE ACCIÓN</i>	55
7.- DISCUSION	57
8.- CONCLUSIONES	61
9.- BIBLIOGRAFIA	62

## RESUMEN

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por voltaje están presentes en la superficies de todas las células excitables (Hagiwara, 1983; Reuter, 1983; Hille, 1984; Tsien, et al. 1987; Bean, 1989). Debido a las propiedades funcionales de estos canales, tales como su selectividad y a su cinética, ellos median el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la superficie membranal, además de la participación de otras proteínas que se encuentran en la superficie de la membrana como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ .

El control del influjo del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un papel importante en el acoplamiento de los eventos eléctricos de la superficie membranal con una gran variedad de funciones celulares, que incluyen contracción, secreción y expresión genética.

En el corazón, el flujo transmembranal de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  es vital para la actividad eléctrica y mecánica. El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales influencia la duración del potencial de acción y del periodo refractario (DiFrancesco y Noble, 1985; Rasmusson, et al., 1990).

El objetivo del presente trabajo fué el describir el comportamiento macroscópico del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L en miocitos ventriculares de rata adulta desde el punto de vista cinético.

Para este estudio se utilizaron miocitos ventriculares aislados enzimáticamente a partir de corazón de rata adulta (250-350 g) mediante el método de Langendorff. El registro de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) se llevó a cabo mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch-clamp*) en su configuración de célula entera (*whole-cell*). Los resultados obtenidos muestran un curso temporal de  $I_{\text{Ca}}$  con una activación monoexponencial definida por una constante de activación ( $\tau$ ) de 1.7 MS, y una fase de decaimiento biexponencial ( $\tau = 6.83$  ms y otra  $\tau = 635.7$  ms), la cual no se inactivó completamente. El pico de la corriente se alcanzó a los 7 ms. La relación corriente-voltaje (I-V) mostró un umbral de activación a -40 mV, una corriente máxima de  $802.7 \pm 131.6$  picoamperios (pA) a -10 mV y un potencial de inversión en aproximadamente +35 mV. La normalización de la corriente hecha en función del tamaño celular, dio como resultado

una densidad de corriente de  $11 \pm 1.8$  pA/pF a  $-10$  mV. Estos parámetros mostraron un comportamiento claramente dependiente de voltaje. La cinética estacionaria se definió mediante la medición de los parámetros de activación ( $d_{\infty}$ ) e inactivación ( $f_{\infty}$ ). La curva de activación se caracterizó por un potencial de umbral ( $V_h$ ) de  $-23.1$  mV y una pendiente ( $k$ ) de  $6.2$  mV. Mientras que la curva de inactivación presentó un  $V_h$  de  $-39$  mV y una  $k$  de  $5.2$  mV. La corriente de ventana, obtenida por la multiplicación de  $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$ , indicó la participación del 4 % de los canales de  $Ca^{2+}$ . De acuerdo con nuestros resultados,  $I_{ca}$  se comporta de una manera muy cercana a la propuesta por Hodgkin y Huxley (1952) para la corriente de  $Na^+$ .

## 2. INTRODUCCION

El sistema cardiovascular tiene la función de transportar nutrientes desde los sitios de ingreso al organismo (pulmones e intestinos) hasta los sitios de consumo (células de la economía), al mismo tiempo que remueve las sustancias de desecho producidas por los tejidos y las transporta para su excreción (pulmones y riñones). Esta función se cumple mediante una organización estructural y funcional precisa, la cual consiste básicamente en un circuito tubular de conducción (sistema vascular) y un mecanismo de propulsión (corazón).

El mecanismo de propulsión está a cargo del corazón que es un órgano muscular estriado dividido en cuatro cámaras: dos aurículas y dos ventrículos que funcionan a manera de bomba, que le permite generar una presión impulsora de sangre hacia los tejidos una vez que ésta ha sido enviada a los pulmones en forma desoxigenada y regresando al corazón ya oxigenada. De la misma manera, el corazón hace llegar a los tejidos de la economía hormonas, neurotransmisores y otros mensajeros desde sus sitios de origen.

La capacidad del corazón para actuar como bomba, depende de su capacidad para generar rítmicamente impulsos eléctricos que se propagan de forma ordenada a todo el miocardio. El impulso cardiaco se genera en las células automáticas del nodo senoauricular (SA) y se propagan de manera secuencial y progresiva a las aurículas, nodo aurículo-ventricular (AV), sistema His-Purkinje y músculo ventricular. Esta compleja secuencia se repite durante cada latido cardiaco.

El impulso cardiaco se propaga debido a una propiedad de las células cardiacas que es su excitabilidad, es decir, a la capacidad de responder a estímulos externos (químicos-neurotransmisores, mecánicos, térmicos o eléctricos) generando una respuesta eléctrica, el potencial de acción cardiaco (PA) a la que va acoplada la correspondiente respuesta contráctil.

Todas las células poseen un potencial de membrana ( $E_m$ ) que es la diferencia de potencial entre el medio externo y el medio interno celular. Generalmente se han encontrado valores entre  $-90\text{ mV}$  y  $-60\text{ mV}$ , y se le denomina potencial de reposo cuando no son excitadas.

El potencial de reposo está determinado por el balance entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente electroquímico (permeabilidad de la membrana para cada ión) y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente. Específicamente, el potencial de reposo está dado principalmente por una corriente de  $K^+$ , conocida como corriente de rectificación entrante, ( $I_{K1}$ ). La principal característica de estos canales es que dejan pasar corriente hacia el interior de la célula más fácilmente que hacia afuera de la misma. Debido a la presencia de esta rectificación entrante, el flujo neto de  $K^+$  es relativamente pequeño en el músculo cardíaco.

El potencial de acción (PA) lo podemos definir como la resultante de una serie de cambios secuenciales en la conductancia de la membrana cardíaca a distintos iones y se genera cuando se alcanza el potencial umbral.

El citoesqueleto de la fibra muscular se encuentra altamente especializado y se integra por elementos contráctiles que se organizan longitudinalmente en subunidades denominadas miofibrillas de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las miofibrillas constituyen la maquinaria contráctil de la célula, y le permite la transformación de energía eléctrica en actividad mecánica determinante de la función cardíaca. Las miofibrillas a su vez están formadas fundamentalmente por dos tipos de proteínas contráctiles: actina y miosina; las cuales presentan una estructura fibrilar que les permite interdigitarse alternadamente y deslizarse entre sí durante la contracción. La unidad funcional, denominada sarcómera, se delimita por dos líneas Z y se repite cada 2.3  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje longitudinal de la miofibrilla. Las bandas oscuras y gruesas corresponden a las bandas A, las cuales se forman por interdigitación de filamentos de actina y miosina. En el centro de las bandas A aparece otra región menos densa llamada región H, integrada exclusivamente por filamentos de miosina. Por su parte, la banda más clara corresponde a la llamada banda I y se forma por filamentos de actina y tropomiosina intercalados con la proteína globular troponina.

Cada una de las miofibrillas se halla en estrecho contacto con dos sistemas membranales. Uno de ellos es el sistema tubular transversal (STT) o túbulos-T, el cual es una prolongación tubular del sarcolema en forma radial. El otro es una estructura

intracelular denominada retículo sarcoplásmico (RS), el cual es un organelo análogo al retículo endoplásmico (RE), presente en otros tipos celulares.

La cadena de eventos que conducen a la contracción muscular inicia con la despolarización de la membrana celular más allá de cierto valor crítico (umbral), lo cual permite el disparo de un potencial de acción. La onda de despolarización así generada se propaga radialmente en forma activa por el túbulo-T. La señal eléctrica induce la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , debido a sus características dependencia de voltaje y de tiempo. Estas propiedades del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  le permiten abrirse en respuesta a una despolarización de la membrana, mediante cambios en su estructura terciaria. Tal apertura induce un aumento de la conductancia al  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual permite la entrada de este catión para dar lugar al mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (Fabiato, 1983). Como resultado de esta secuencia de eventos el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado hacia el mioplasma debido a la apertura de los canales sensibles a la rianodina, los cuales se abren debido a la activación que sufren gracias a la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  que entró a la célula a través del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L. El  $\text{Ca}^{2+}$  así liberado, difunde hacia los filamentos de actina y miosina activando como resultado generación de tensión.

La relajación del miocito se debe a la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  libre mioplásmico, lo cual resulta de la recaptura de este catión por el RS y a su salida de la célula mediante la acción de bombas (ATPasas) que se encuentran en la membrana plasmática, además al cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante su inactivación dependiente de voltaje (Cota et al., 1984; Mejía-Alvarez et al., 1991) y de  $\text{Ca}^{2+}$ : (Brehm y Eckert, 1978; Tillotson, 1979).

Durante cada latido cardiaco, la  $[\text{Ca}^{2+}]$  libre en el mioplasma primero se eleva rápidamente (hasta casi 10  $\mu\text{M}$  en las inmediaciones del canal de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ ), para luego decaer gradualmente a sus niveles originales o basales (entre 10 y 100 nM). El incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular no es homogéneo, sino que parece estar más bien organizado en espacio y en tiempo (de Waard, et al, 1996). Cuando la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  mioplásmico es baja (menor de 1  $\mu\text{M}$ ), la fuerte tendencia de la miosina a unirse con la actina es inhibida por las proteínas troponina y tropomiosina que forman parte de los filamentos delgados. Cuando la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el mioplasma se eleva por arriba de  $1 \times 10^{-6}$  M el  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la troponina y causa un cambio conformacional tanto en la troponina como en la tropomiosina, de modo que los sitios de unión de la miosina

en la actina son expuestos. De tal manera que, los filamentos delgados se “activan” y son capaces de interactuar con las proyecciones laterales de los filamentos gruesos dando lugar a los puentes cruzados (Taylor y Amos, 1981).

Cuando la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) cae (por debajo de  $1 \times 10^{-7}$  M), la interacción de los filamentos desaparece, la fuerza decae y el acortamiento cesa. De modo que podemos decir que la contracción muscular es gobernada finalmente por la concentración de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  así como por la velocidad de su eliminación del mioplasma. Sin embargo, la contracción continúa por algún tiempo (decenas de milisegundos) después de que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ha decaído, lo que indica que otros procesos toman tiempo durante la relajación, presumiblemente aquellos asociados con la ruptura de los puentes cruzados.

La morfología del potencial de acción se determina por el flujo transmembranal de los distintos iones presentes a ambos lados de la membrana,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . La secuencia de las corrientes iónicas que participan en el potencial de acción (PA) es la siguiente. El potencial de acción se origina cuando la membrana se despolariza por encima de un umbral crítico (-60 mV) lo cual induce apertura de los canales de  $\text{Na}^+$ , permitiendo así el flujo de  $\text{Na}^+$  hacia el interior de la célula. Esto corresponde a la despolarización rápida inicial del potencial de acción conocida como fase 0. Sin embargo, como resultado de esta despolarización, la corriente de sodio ( $I_{\text{Na}}$ ) se inactiva rápidamente, esto es, que entra en un estado no conductor-absorbente. Casi simultáneamente, pero a una menor velocidad, se activa una corriente saliente presumiblemente de  $\text{K}^+$ , la cual se inactiva rápidamente, razón por la cual se ha denominado transitoria ( $I_{\text{KTo}}$ ). Esta corriente induce la repolarización característica de la fase 1. Asimismo, y como consecuencia de la despolarización rápida se activa una segunda corriente entrante más lenta, esta corriente esta dada por el ingreso del  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ). Esta corriente despolarizante se activa con relativa lentitud (comparada con la activación de  $I_{\text{Na}}$ ), de forma que produce en algunos tejidos cardiacos una segunda despolarización, o joroba, en el potencial de acción y se genera así la fase de meseta del PA.

En la fase de meseta, el potencial transmembrana se “mantiene” relativamente estable (cerca de 0 mV) por aproximadamente 100 ms. El final de esta fase del PA se precipita por dos factores: a) disminución de  $I_{\text{Ca}}$  (debido a su inactivación dependiente de

tiempo y voltaje), y 2) activación de una corriente saliente de  $K^+$  ( $I_K$ ), lo cual conduce hacia la repolarización celular.

En conclusión, estos eventos eléctricos son el factor desencadenante de procesos intracelulares que terminan en la generación de tensión, y uno de los más importantes a ambos niveles es  $I_{Ca}$ . Por tal motivo la definición de las propiedades funcionales de  $I_{Ca}$  ha sido motivo de extensa investigación durante los últimos años. Sin embargo, se han llevado a cabo muy pocos trabajos en los que se estudien dichas propiedades desde un punto de vista integral, es decir, en donde se describan las propiedades biofísicas de  $I_{Ca}$ , al mismo tiempo que prediga su comportamiento durante el PA. Así pues el objetivo de esta tesis fue dar un panorama general sobre el comportamiento de  $I_{Ca}$  durante el PA.

### 3. ANTECEDENTES

Julius Berstein (1902 y 1912) propuso que las células excitables se encuentran rodeadas por una membrana selectivamente permeable a iones  $K^+$  en reposo y que durante la excitación la permeabilidad a otros iones incrementaba. Su “hipótesis de membrana” explicó el potencial en reposo del nervio y del músculo como un potencial de difusión en movimiento por la tendencia de los iones cargados positivamente a difundir desde una región de alta concentración en el citoplasma a otra de baja concentración en la solución extracelular. Durante la excitación la negatividad interna se pierde transitoriamente cuando los iones comienzan a difundir a través de la membrana.

#### **3.1.- Canales Iónicos.**

Los canales iónicos son proteínas de gran tamaño que se encuentran como componentes fundamentales de las membranas excitables y que conforman una vía de acceso transmembranal para diversos iones. Tales vías se interpretan como poros o túneles estrechos, llenos de agua, permeables a determinados iones y moléculas pequeñas. Aunque la diversidad de los canales iónicos es menos amplia que la de las enzimas, hay muchos tipos de canales trabajando en concierto, abriéndose y cerrándose para formar señales eléctricas propagables en tejidos excitables. Los canales iónicos actúan como sensibles pero potentes amplificadores que pueden generar violentas descargas eléctricas como en el caso de la anguila eléctrica o en la raya eléctrica. (Hille, B., 1992).

La excitación y las señales eléctricas en el sistema nervioso y en el músculo involucran una serie de flujos iónicos a través de los canales. La respuesta de los canales a los estímulos se traduce como una simple apertura y cierre del poro (“gating”).

La selectividad es una propiedad importante de los canales iónicos, y que consiste en permitir el paso restringido de una clase de iones que fluyen pasivamente en favor de su gradiente electroquímico a una velocidad muy alta ( $>10^6$  iones/s) (Hille, B., 1992).

La selectividad de los canales iónicos permite dividirlos en familias y en subfamilias. Las principales familias de acuerdo a este parámetro son: canales de  $\text{Na}^+$ , canales de  $\text{Cl}^-$ , canales de  $\text{K}^+$  y canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Algunos canales se subdividen en varios tipos, como los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (tipos T, -N, y -L), y los de  $\text{K}^+$  ( $\text{I}_{\text{to}}$ ,  $\text{I}_{\text{K}}$  y  $\text{I}_{\text{K1}}$ , etc.). Estos tipos se distinguen además por presentar diferentes propiedades cinéticas. Otra forma de dividirlos es por su dependencia de voltaje, si dependen de ligando o si son sensibles a estiramiento mecánico. Uno de los últimos avances en la década de los 80s ha sido la secuenciación por métodos de biología molecular de los RNAs mensajeros y de los genes que codifican para los canales iónicos. Estos métodos han revelado una similitud estructural en la secuencia de sus aminoácidos lo cual habla de familias homólogas, lo cual podría indicar un canal común como ancestro a los desarrollados en la actualidad (Hille, B., 1992).

### **3.2.- Generalidades de los Canales de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran entre las proteínas más importantes que forman parte del sarcolema cardiaco (Zipes y Jalife, 1990). En los 70's Reuter y colaboradores describieron una corriente entrante, lenta y transitoria en el músculo cardiaco. Posteriores trabajos mostraron que esta corriente se debe principalmente al influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Tsien, R. et al. y Lee, et al. 1985), con propiedades similares a las de la  $\text{I}_{\text{Ca}}$  encontrada en los cuerpos celulares de las células nerviosas y en el músculo esquelético.

En la actualidad se conoce que estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje participan en el acoplamiento de los eventos eléctricos del sarcolema con una amplia variedad de funciones celulares, que incluyen secreción, contracción y expresión genética (Balke, et al, 1993). Estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son altamente permeables y muy selectivos para los iones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  fluye hacia el interior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico desde una concentración extracelular del rango milimolar ( $10^{-3}$  mol /L) a una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en reposo del orden submicromolar ( $10^{-6}$  M; Patridge 1991; Sipido y Weir, 1991). El incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  citosólico dado en principio por  $\text{I}_{\text{Ca}}$  se potencia por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol desde los compartimentos intracelulares de almacén de  $\text{Ca}^{2+}$  como el retículo sarcoplásmico.

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L se caracterizan por las siguientes propiedades: 1) fluye a través de un grupo homogéneo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) a concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  externo ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ), la relación I-V tiene forma de campana, con un potencial umbral de alrededor de -40 mV, un máximo de corriente de alrededor de 0 mV y un potencial de inversión ( $E_{rev}$ ) extrapolado entre +50 a +70 mV; 3) la conductancia del canal abierto prácticamente ohmica; 4) la selectividad de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por iones  $\text{Ca}^{2+}$  sobre iones  $\text{Na}^+$  es grande. Algunos cationes divalentes como el  $\text{Ba}^{2+}$  y el  $\text{Sr}^{2+}$ , pero no el  $\text{Mg}^{2+}$  son buenos acarreadores de la corriente como sustitutos del  $\text{Ca}^{2+}$ ; 5) la cinética del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha supuesto puramente dependiente de voltaje, con una activación e inactivación gobernada por procesos de primer orden. La activación ( $d_\infty$ ) y la inactivación ( $f_\infty$ ) en el estado estacionario son funciones sigmoideas de voltaje, con valores de voltaje medio ( $V_h$ ), cercanos a -20 mV; 6)  $I_{ca}$  se bloquea por diversos cationes, como  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^+$ , y  $\text{Cd}^{2+}$ . Además, la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se bloquea también por compuestos orgánicos (llamados antagonistas) de una manera en la cual son dependientes del voltaje y de la frecuencia de estimulación; 7) los neurotransmisores regulan  $I_{ca}$  sin alterar su cinética (Pelzer, et al., 1990).

Mediante la apertura y cierre se controla directamente la entrada del ión  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular, la cual: 1) media la transferencia de cargas positivas despolarizantes, y 2) sirve como un mensajero químico debido a la importancia funcional de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero universal. De tal modo, que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : a) contribuyen a la conducción del impulso y a la actividad rítmica; y b) actúan como transductores para convertir la información eléctrica en energía química, la cual induce respuestas celulares específicas vía enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o de proteínas unidas al  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la célula.

### **3.2.1. Clasificación de los Canales de $\text{Ca}^{2+}$ .**

Con base en sus propiedades biofísicas y farmacológicas se han definido cinco clases de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (ver tabla 1). De acuerdo a su umbral de activación se han identificado diversas categorías de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ : 1) de bajo umbral

(LVA; tipo-T), los cuales se inactivan rápidamente, y 2) canales de alto umbral (HVA; tipos-L, -N, -P y -R; de-Waard, et al., 1996).

Tabla 1. Clasificación Biofísica de los Canales de  $Ca^{2+}$  LVA y HVA.

PROPIEDAD	TIPO				
	T	L	N	P	R
Conductancia	7 a 10 pS	11 a 25 pS	10 a 22 pS	9 a 19 Ps	14 pS
Umbral de activación.	> -70 mV LVA	>-30 mV HVA	>-30 mV HVA	> -40 mV HVA	> -40 mV HVA
Rango de inactivación.	-110 a -50 mV	-60 a -10 mV	-120 a 30 mV	?	-100 a -40 mV
Velocidad de inactivación.	14 a 80 ms.	>500 ms	50 a > 500 ms	> 500 ms	20 a 40 ms
Conductancia relativa.	$Ba^{2+} = Ca^{2+}$	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	$Ba^{2+} > Ca^{2+}$	?	$Ba^{2+}Ca^{2+}$
Duración del tiempo de apertura	0.5 a 2 ms	0.5 a 10 ms.	0.7 a 1.5 ms.	< 1 ms	?
Modos de gating.	?	2	3	?	?

Los valores de conductancia se estimaron de los registros usando de 90 a 110 mM de  $Ba^{2+}$  como ion acarreador de la corriente. Los dos modos de gating de los canales tipo-L están basados en el cambio de la actividad de una duración de tiempo de apertura de corta vida a otro de larga vida. Los canales tipo-N tienen tres modos de gating que son debidos a los cambios de las probabilidades de apertura el canal baja, media y alta (Delcour y Tsien, 1993).

### 3.3. Canal de $Ca^{2+}$ tipo-L.

Los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L representan probablemente el grupo más heterogéneo de los canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje. Se encuentran en una gran variedad de tejidos (cardíaco, secretores, o en neuronas) en los que tienen propiedades funcionales muy similares. Estos canales tienen un conductancia unitaria que varía entre 11 y 25 pS, y una inactivación dependiente de tiempo y de voltaje (de Waard, et al., 1996). Este canal es sensible a las dihidropiridinas (DHP's) por lo cual es conocido también como canal de  $Ca^{2+}$  sensible a las DHP's o receptor de DHP's (denominado así erróneamente pues no

existen análogos endógenos). Son altamente permeables a una variedad de cationes monovalentes en ausencia de cationes divalentes; el flujo de cationes monovalentes es bloqueado por concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  del orden micromolar de una manera dependiente de voltaje (Tsien et al., 1987), sin embargo muestran diferencias importantes en su interacción con cationes divalentes (Tsien et al., 1987).

Su cinética dependiente de tiempo y voltaje facilita la conversión de la despolarización de la membrana en una señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que puede inducir varias repuestas celulares como la contracción. Este canal es sensible al bloqueo por cationes inorgánicos como el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , además de ser sensibles a agonistas como las DHPs y a las sustancias adrenérgicas (fenilefrina, adrenalina, etc.).

### **3.4. Canal de $\text{Ca}^{2+}$ Tipo-L cardiaco.**

#### **3.4.1. Papel Funcional.**

El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales tipo-L es esencial para la actividad eléctrica normal y para el acoplamiento. Este  $\text{Ca}^{2+}$  modula o induce otros sistemas regulatorios (p.e. la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico; Fabiato, 1986), a varios sistemas enzimáticos y a las proteínas de unión al  $\text{Ca}^{2+}$  (p.e. Calmodulina o troponina) y a los sistemas de extrusión y acarreadores transmembranales (p.e. bomba electrogénica  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP; Campbell y Giles, 1990). Además,  $I_{\text{Ca}}$  influencia de manera importante la duración del PA (Eick, Whalley y Rasmussen, 1992.) y del periodo refractario (PR) de las células cardiacas (DiFrancesco et al., 1985; Rasmusson, et al, 1990; Rasmusson, et al., 1990). A diferencia de lo que ocurre en el músculo esquelético, la entrada de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  es fundamental para poder inducir la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el retículo sarcoplásmico (RS) mediante el mecanismo descrito por Fabiato para el tejido cardiaco de "liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ " (Fabiato, 1986).

Por otro lado, se han realizados numerosos estudios para caracterizar el número de receptores funcionales sensibles a las DHP's lo cual ha resultado muy controvertido. Lew, et al. (Lew, et al, 1991) calcularon el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  funcionales en músculo cardiaco de mamífero. La densidad de receptores a DHP's que encontraron fue

de 14.6 por  $\mu\text{m}^2$ . Ellos consideraron una probabilidad de apertura ( $P_o$ ) estacionaria de 0.03 y determinaron que la densidad de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  funcionales es de 15.1 por  $\mu\text{m}^2$ . Esto demostró que el músculo cardíaco prácticamente el 100% de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L son funcionales, lo cual es consistente con la marcada dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo que se presenta en este músculo.

Partiendo del hecho de que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son sensibles a las-DHP's, debe de haber una correlación entre el receptor a las DHP's (rDHP) y el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  debido a que el rDHP se encuentra formando parte de la subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L en la que se le atribuye una capacidad de sensibilidad al voltaje (Aiba y Creazzo, 1993). De tal forma que de ser cierta esta suposición, por lo menos formaría parte del sensor de voltaje además de estar directamente relacionado con el acoplamiento excitación-contracción. No obstante, evidencias experimentales demuestran que el número de rDHP es mayor que el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L funcionales, lo cual se podría explicar de varias formas. Es posible la existencia de canales "silenciosos" o no funcionales en el corazón embrionario (Renaud, et al., 1984), los cuales pueden volverse funcionales de manera que no pudieran ser determinados. Otra posibilidad es que haya rDHP que puedan localizarse en otros tipos celulares, como en músculo liso o que algunos DHPr sean intracelulares, de modo que estén transitando hacia, o desde el sarcolema en miocitos cardíacos y puedan no ser detectados por el análisis fluctuacional (Aiba y Creazzo, 1993).

### ***3.4.2 Localización y Estructura***

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L se encuentran en mayor abundancia en la membrana del túbulo-T, el cual es una prolongación de la membrana celular hacia el interior de la célula, además de que se encuentra topográficamente cerca del retículo endoplásmico.

El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L cardíaco esta compuesto de 5 subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . La subunidad  $\alpha_1$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  contiene cuatro subunidades unidas por uniones peptídicas que rodean el poro del canal. A esta subunidad se le atribuyen las principales características del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L como lo son: su permeabilidad, su sensibilidad al voltaje, (Katz, 1992.; deWaard, et al., 1996), su cinética y su sensibilidad a las DHP (Striessnig, et al., 1991). La subunidad  $\alpha_1$  esta formada a su vez por cuatro dominios

transmembranales homólogos (I-IV), contiendo cada dominio seis segmentos transmembranales  $\alpha$ -hélice (S1-S6). El sitio de unión a las DHP's es esencialmente extracelular y esta formado por dos secuencias extracelulares de las hélices S6 de los dominios III y IV<sub>2</sub> y el asa entre las hélices S5 y S6 del tercer dominio. El segmento S4 es el responsable de las corrientes de compuerta y se le conoce como sensor de voltaje, este segmento contiene varios aminoácidos cargados positivamente, los cuales se encuentran en todos los canales sensibles a voltaje.

La subunidad  $\beta$  tiene una localización extracelular (Takahashi, et al., 1987). Esta subunidad es susceptible de ser fosforilada por una proteína cinasa dependiente de AMPc (PKC) y por una proteína cinasa dependiente de GMPc (Jahn, et al., 1988).

La subunidad  $\alpha_2\delta$  es un complejo compuesto por los péptidos  $\alpha_2$  y  $\delta$  unidos por puentes disulfuro; esta es una unidad altamente glucosilada.

La subunidad  $\gamma$  es una proteína transmembranal que se encuentra también glucosilada, es muy hidrofóbica y se propone que tiene cuatro hélices transmembranales (deWaard, et al., 1996).

### **3.4.3. Permeabilidad.**

Una de las propiedades fundamentales de los canales iónicos es su selectividad. Aunque esta selectividad no es perfecta, la preferencia de los distintos canales por una variedad iónica particular es grande. De tal forma que aunque en el fluido extracelular hay casi 100 veces más  $\text{Na}^+$  que  $\text{Ca}^{2+}$ , los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  permiten la conducción de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  principalmente. Una explicación a esta conducta es que los canales, en este caso de  $\text{Ca}^{2+}$ , tienen sitios de unión en el interior del canal que tienen una mayor afinidad por este ion que por otros (tanto divalentes como monovalentes). Se han propuesto dos modelos de permeación conocidos como "single-file pore" y "multi-ion occupancy". El modelo de un sitio postula que el sitio puede contener un sólo ión de  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad o dos iones con baja afinidad. Este modelo se concibe como un sitio altamente capaz de mantener dos iones en estrecha proximidad, pero localizados en una estrecha región del poro. El sitio de unión se encuentra en el interior del poro (Yellen, 1993). El otro modelo propuesto llamado multi iónico considera dos sitios de unión para el  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos sitios

son de alta afinidad para el  $\text{Ca}^{2+}$  de tal manera que el paso de estos iones a través del canal se considera que ocurre en fila, pero la afinidad de los sitios disminuye cuando están ocupados ambos sitios en el canal debido principalmente a la repulsión electrostática, de manera que se permite el flujo rápido de los iones a través del canal (Yellen, 1993).

Las bases estructurales de la selectividad del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  se han demostrado que residen fundamentalmente en el anillo de glutamatos cargados negativamente que se encuentran en el segmento SS2 de la subunidad  $\alpha_1$ . Los experimentos realizados en los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L por Yang y cols. (Yang, et al., (1993) demostraron esta importancia fundamental de los residuos de glutamato en el segmento SS2 para la selectividad iónica y para la unión de alta afinidad para los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Junto con los de otros investigadores, estos resultados apoyan la identificación del segmento SS1-SS2 como constituyente del poro del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estructuralmente se manejan dos modelos, en uno de ellos los glutamatos tienen en un arreglo simétrico y se encuentran en un plano perpendicular a la vía de permeación. En el otro modelo, asimétrico, los carboxilos contribuyen de manera distinta al sitio de unión de alta afinidad para los cationes divalentes, como el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Ca}^{2+}$ . Este arreglo asimétrico contribuye al arreglo de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  de manera simultánea de manera que permite la competencia por los sitios de unión carboxilados y la repulsión electrostática entre ambos iones disminuye la afinidad y promueve el influjo de los iones al interior de la célula.

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L en células musculares son permeables a un gran número de cationes inorgánicos. Experimentos con soluciones externas que contienen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  o  $\text{Ba}^{2+}$  milimolar demuestran que estos cationes contribuyen a las corrientes macroscópicas del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en preparaciones multicelulares (Kohlhardt, et al., 1975; Kass, et al, 1984), como en miocitos cardiacos aislados (Mitchell et al.,1983; Lee et al., 1985, Campbell et al., 1985a). Las corrientes inducidas por estos iones han sido resueltas a nivel unitario en miocitos cardiacos (Hess, et al., 1986).

#### **3.4.4.- Bloqueo del Canal de $Ca^{2+}$ .**

El bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  se puede inducir mediante el uso de algunos metales de transición como el  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ , a concentraciones entre 10  $\mu M$  a y 20 mM. El análisis de dependencia de concentración del bloqueo con mezclas de iones sugieren que hay una competencia por el sitio de unión en el canal (Hagiwara, et al., 1967; Hagiwara, et al. 1974). Hay además varias sustancias conocidas como antagonistas de  $Ca^{2+}$  que son de gran utilidad clínica por sus efectos sobre el corazón y sobre el músculo liso vascular (Fleckenstein, 1985). Estos compuestos, solubles en lípidos, incluyen al verapamil, D-600, nifedipina, nitrendipina y el diltiazem en un rango de concentraciones que varía entre 20 nM y 50  $\mu M$ . Es importante tener en cuenta que algunas de estas sustancias pueden actuar inhibiendo o incrementando la corriente de  $Ca^{2+}$  debido a que son mezclas racémicas de dos enantiómeros ópticos y su efecto resulta del isómero que predomine (Kokubun, et al. 1984; Bechem et al., 1988).

El efecto bloqueador de las dihidropiridinas depende del potencial de mantenimiento. En experimentos de fijación de voltaje se ha postulado que la nitrendipina se une más fácilmente al canal durante su estado inactivado que en su estado en reposo, lo cual indica una dependencia de voltaje. Además, el canal de  $Ca^{2+}$  puede ser bloqueado por una variedad de toxinas peptídicas naturales (Hille, 1992)

#### **3.4.5.- Cinética del canal de $Ca^{2+}$ .**

La cinética de apertura y cierre (*gating*) del canal de  $Ca^{2+}$  tipo-L es dependiente de voltaje. Tanto la transición del estado cerrado al abierto, conocida como activación, como del abierto a uno cerrado absorbente (inactivado), llamada inactivación, son gobernadas por procesos de primer orden. En el estado estacionario estos dos procesos dependen del voltaje (Pelzer, et al., 1992). Cuando se aplica un pulso despolarizante,  $I_{Ca}$  se activa rápidamente, alcanza un pico y luego decae lentamente (Pelzer y cols., 1992).

El *gating* se refiere a los procesos moleculares que determinan si el canal de  $Ca^{2+}$  esta abierto (conductor) o esta cerrado (no conductor). En el corazón, este proceso es controlado principalmente por los cambios en el potencial eléctrico transmembranal, aunque puede ser modificado por otros factores (otros iones, transmisores, etc.). Los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden residir en por lo menos tres estados discretos de conducción: cerrado (en reposo), abierto (activado), e inactivados (refractario) (Campbell y Giles, 1990).

### **3.4.5.1. Activación**

La activación se refiere a los procesos moleculares inducidos por despolarización de la membrana, que causan que el canal transite del estado cerrado (reposo, no conductor) al abierto (conductor). Este proceso refleja la conducta de la partícula sensora de potencial, que permite modificar el arreglo tridimensional de la proteína que forma el canal. Esta reorientación induce cambios conformacionales que llevan al estado activado del canal (Campbell y Giles, 1990).

El proceso de activación de  $I_{\text{Ca}}$  se alcanza cuando aplicamos un pulso despolarizante que induce la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta corriente que fluye encuentra un pico máximo y entonces decae. Los primeros estudios de  $I_{\text{Ca}}$  en células cardiacas realizados por Isenberg y Klöckner (1980, 1982), reportaron que  $I_{\text{Ca}}$  inducida por la despolarización a 0 mV alcanzó su pico de corriente a los 2-4 ms en miocitos cardiacos ventriculares de rata y bovino a 35°C.

Se ha demostrado por registros a nivel unitario (corriente ensamblada) y a nivel macroscópico que este proceso de activación sigue un curso temporal de tipo sigmoide. Esto indica que la activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  involucra la transición entre más de un estado cerrado al abierto (Reuter, et al., 1982; Cavalié, et al., 1983).

Este curso temporal sigmoide puede explicarse mediante un modelo cinético donde se incorporen al menos dos estados cerrados de vida corta que precedan al estado de apertura del canal. Las transiciones entre los distintos estados es altamente dependiente de voltaje y ocurren en una escala temporal en el orden de milisegundos. Este modelo de activación sería así:  $C \leftrightarrow C \leftrightarrow O$ , donde la C denota el estado cerrado o no conductor y O el estado de apertura o de activación.

### 3.4. 5.2.- Inactivación de $I_{Ca}$

La inactivación se refiere a aquellos procesos que fundamentan la entrada del canal hacia un estado cerrado, no conductor y absorbente (del cual no se puede salir sin restaurar las condiciones originales), donde no se encuentra disponible para activarse (Campbell y Giles, 1990). El proceso de inactivación de  $I_{Ca}$  en corazón ha sido explicado por dos mecanismos: 1) dependiente de voltaje y 2) dependiente de  $Ca^{2+}$ .

Los primeros indicios de la inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$  se obtuvieron en estudios realizados en neuronas de varios moluscos y del *Paramecium* (Ecker y Chad, 1984; Ecker y Chad, 1986). Esta hipótesis condujo a los siguientes puntos: la velocidad de inactivación durante una despolarización, podría incrementarse cuando la amplitud de la  $I_{Ca}$  incrementa por un aumento del  $Ca^{2+}$  extracelular; la velocidad de inactivación durante una despolarización podría disminuir cuando otros cationes que no sean el  $Ca^{2+}$  pasen a través de este canal (p.e.  $Ba^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  o algunos cationes monovalentes; Bean, 1989; Josephson, et al, 1984); la velocidad de inactivación de la  $I_{Ca}$  podría disminuir cuando el  $Ca^{2+}$  entrante es amortiguado con EGTA intracelular (Bechem y Pott, 1985; Fedida, et al, 1988; Josephson, et al., 1984.); la curva de inactivación en el estado estacionario obtenida mediante el método de dos pulsos no es una función lineal de voltaje, sino que se determina por la amplitud de la corriente durante el primer pulso (Pelzer, et al, 1992).

La evidencia de la inactivación dependiente de voltaje se ha obtenido de estudios realizados tanto en célula completa como a nivel unitario, y se ha descrito como un mecanismo intrínseco de estos canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L cardiacos. Las corrientes del canal de  $Ca^{2+}$  tipo-L sufren inactivación aún cuando son acarreadas por otros cationes divalentes como el  $Ba^{2+}$  y el  $Sr^{2+}$  (Josephson, et al., 1984; Kass, y Sanguinetti, 1984), o por cationes monovalentes como el  $Na^+$  (Hadley y Hume, 1987; Hess y Tsien, 1984).

### 3.4.5.3.- Modelo de Hodgkin y Huxley

En los años cincuentas Hodgkin and Huxley (HH) desarrollaron un modelo para predecir el comportamiento de la corriente de  $Na^+$  ( $I_{Na}$ ) y de  $K^+$  ( $I_K$ ). Este modelo describe las propiedades dependientes de tiempo y de voltaje de los mecanismos de "gating" de los canales en axón gigante de calamar. La propuesta de HH se basa en la existencia de

dos procesos independientes,  $m$  y  $h$  los cuales definen los fenómenos de activación e inactivación, respectivamente.

El término  $m$  aparece como el coeficiente de activación que define la probabilidad de que el canal de  $\text{Na}^+$  se encuentre abierto, en tanto que  $h$  es el coeficiente de inactivación que define la probabilidad de que el canal de  $\text{Na}^+$  no se encuentre inactivado.

De acuerdo al modelo de HH, la magnitud de la corriente de sodio ( $I_{\text{Na}}$ ) está definida por estos dos coeficientes y por la conductancia máxima del canal. Debido a que  $m$  es el coeficiente de activación y  $h$  el coeficiente de inactivación,  $I_{\text{Na}}$  aumenta cuando incrementa  $m$  y disminuye  $h$ . La ecuación propuesta por el modelo de HH para definir  $I_{\text{Na}}$  es la siguiente:

$$I_{\text{Na}} = m^3 h g_{\text{Na}} (E_m - E_{\text{Na}}) \quad (1)$$

El exponente de activación tiene un valor de 3, lo que sugiere una interacción cooperativa entre tres sitios o compuertas, cada una con probabilidad  $m$  de asumir determinada configuración en el control de la apertura del canal. La amplitud de  $I_{\text{Na}}$  también depende de la conductancia máxima al sodio ( $g_{\text{Na}}$ ) y de la fuerza electromotriz diferencia entre  $E_m$  y  $E_{\text{Na}}$ . La dependencia del voltaje de la apertura del canal tiene dos efectos opuestos.

El modelo de HH predice también el curso temporal de los procesos de activación e inactivación; las compuertas  $m$  abren mucho más rápido que las compuertas  $h$ , después de que la membrana ha sido despolarizada. Por esta razón, la respuesta inicial a la despolarización es la apertura de las compuertas  $m$ . El lento incremento del otro parámetro,  $h$ , inactiva eventualmente el canal. Para retornar al estado de reposo el canal se tiene que reactivar mediante repolarización. La cual una vez lograda las compuertas  $m$  se cierran y las  $h$  se reabren; debido a que las compuertas  $m$  cierran más rápido que las compuertas  $h$  se abren, los canales de sodio no reabren durante la recuperación. Hodgking y Huxley concluyeron que estos dos procesos el de activación rápida y el de inactivación más lenta en los canales de sodio son mediados por los dos procesos descritos líneas arriba. La activación tiene un curso temporal sigmoidal durante la despolarización y una

caída exponencial durante la repolarización.

El modelo de HH predice el comportamiento cinético de las conductancias de los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , sin embargo, únicamente mencionamos el comportamiento cinético concerniente al canal de  $\text{Na}^+$  que servirá para dirimir el comportamiento cinético del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ . No obstante, es importante mencionar la ecuación 2 que describe la corriente a través de la membrana:

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + m^3 h g_{\text{Na}} (E - E_{\text{Na}}) + n^4 g_{\text{K}} (E - E_{\text{K}}) + g_l (E - E_l) \quad (2)$$

en donde el cuarto elemento describe el comportamiento de la corriente de fuga inespecífica ( $I$ , leak)

Este modelo también predice la cinética de “gating” para los canales y supone que  $N$  canales homogéneos abren y cierran siguiendo una reacción de primer orden que indica el tiempo de permanencia de los canales en un estado de cierre o de apertura dado por las constantes de transición  $\alpha$  y  $\beta$ , las cuales son independientes del tiempo.

En resumen, el modelo propuesto por Hodgkin y Huxley describe los cambios en la permeabilidad de los canales dependientes de voltaje y de tiempo, y describe la cinética transitoria de la conductancia al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$ . Además de la probabilidad de apertura y cierre de los canales, así como su cinética de “gating”.

## 4. O B J E T I V O S

### *Objetivo General.*

El objetivo general de la presente tesis es describir desde el punto de vista cinético el comportamiento del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L a nivel macroscópico, y correlacionarlo con su papel funcional durante el potencial de acción de miocitos ventriculares de rata adulta.

### *Objetivos Específicos.*

- 1.- Describir las propiedades del potencial de acción de los miocitos ventriculares de rata adulta.
- 2.- Describir el curso temporal de  $I_{\text{Ca}}$
- 3.- Describir las propiedades de permeabilidad de  $I_{\text{Ca}}$  en función del potencial de membrana.
- 4.- Describir la cinética de  $I_{\text{Ca}}$  en el estado estacionario, en términos de los parámetros  $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$ .
- 5.- Describir el componente estacionario de  $I_{\text{Ca}}$ .
- 6.- Definir la amplitud y curso temporal de  $I_{\text{Ca}}$  durante el potencial de acción.

## 5. M A T E R I A L Y M E T O D O S

### 5.1. Aislamiento de miocitos ventriculares.

Se utilizaron ratas *Wistar* adultas de 250-300 g de ambos sexos. La ratas se anestesiaron con tiopental sódico (50 mg/kg) intraperitoneal. Una vez anestesiadas se les practicó una toracotomía, se extrajo el corazón lo más rápido posible y se lavó con 30 ml de solución Tyrode normal (1 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ , ver soluciones experimentales) durante 10 segundos. El aislamiento de los miocitos se llevó a cabo a 37°C mediante la técnica de digestión por perfusión retrógrada utilizando el aparato de Langendorff, lo que permite realizar cambios de soluciones durante el proceso de digestión. Las soluciones y tiempos empleados fueron los siguientes.

1) Recuperación. Perfusión con solución Tyrode normal (1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), durante 3 minutos aproximadamente para permitir que el corazón se recuperara del trauma de la extracción, esto se determinó cuando el corazón recuperó su actividad rítmica. Es importante señalar que a fin de disminuir el impacto hipóxico, el tiempo transcurrido entre la extracción del corazón y el inicio de la perfusión no excedió 30 segundos.

2) Desestabilización de uniones intercelulares. Perfusión con solución Tyrode sin  $\text{Ca}^{2+}$  añadido, durante 20 minutos.

3) Digestión enzimática. Perfusión con solución Tyrode (20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) más colagenasa tipo II (0.0004 mg/ml, Sigma) durante 7:50 min. El objetivo de esta fase fue romper las uniones de colágena.

4) Lavado de la enzima. Perfusión en solución Tyrode (200  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ ) más albúmina (1 mg/ml), durante 8-10 min. con el fin de lavar el corazón de la enzima utilizada y de eliminar también las enzimas proteolíticas que se hallan liberado durante la digestión.

Al término de la digestión se procedió a separar los ventrículos de las aurículas, se depositaron los ventrículos en una caja de Petri de 15 ml la cual contenía solución C conocida también como de alto  $\text{K}^+$  en la cual se cortaron los ventrículos y se filtraron a través de una malla de poro pequeño.

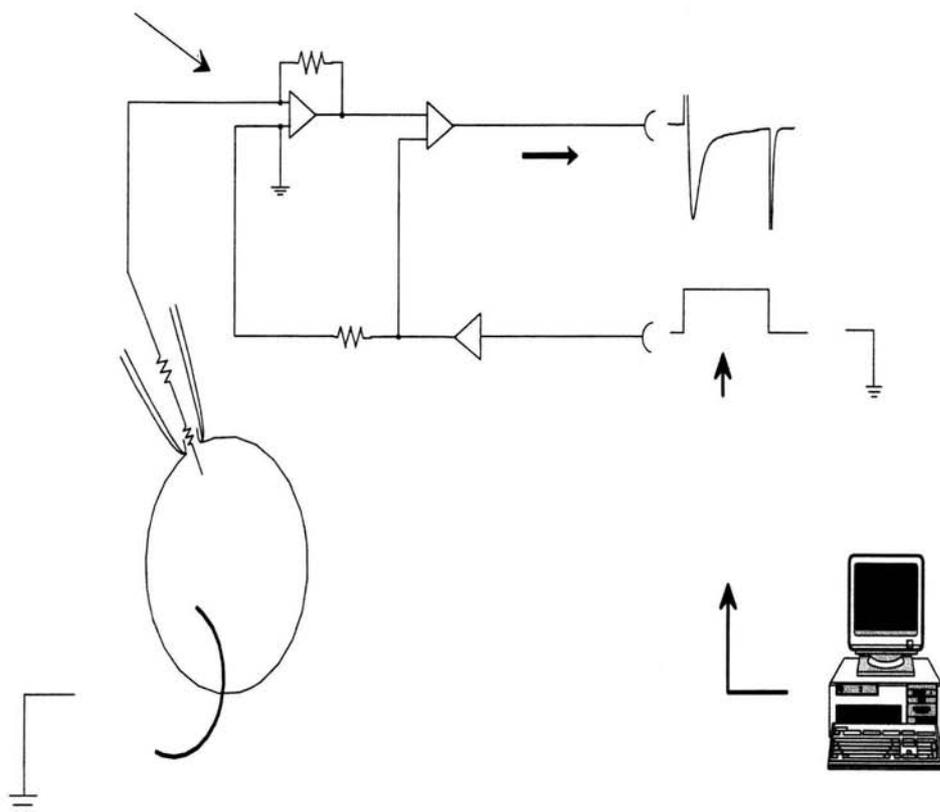
## **5.2. Mediciones Electrofisiológicas.**

### **5.2.1. Registro del Potencial de Acción.**

El registro del potencial de acción se obtuvo mediante la fijación de corriente (*current clamp*), esto es, mediante la aplicación de corriente constante se midió el cambio en el potencial de membrana causado por la aplicación de dicha corriente. El protocolo de estimulación consistió en un pulso de corriente de 1 nA de amplitud con una duración de 10 ms.

### **5.2.2. Registro de $I_{Ca}$ .**

El registro de  $I_{Ca}$  se realizó mediante la técnica de *patch clamp*, en su configuración de *whole cell* (Hamill et al., 1981), la cual permite acceso directo al interior celular luego del rompimiento del parche de la membrana después de la formación de un sello de alta resistencia. La ruptura de la membrana se logra mediante la aplicación de presión negativa o por la aplicación de un pulso de 1 mV. El circuito electrónico que se utilizó se muestra en la Figura 1



**Figura 1. Diagrama de las condiciones experimentales para el registro de  $I_C$ .**  $I_C$  se registró con la técnica de *patch clamp* en su configuración de *whole-cell*. La composición de las soluciones experimentales extracelular (baño) e intracelular (pipeta) se muestra en los recuadros. Por simplicidad no se muestran todos los componentes electrónicos para la fijación de voltaje y procesamiento de la señal.

Las pipetas de registro se fabricaron con vidrio de borosilicato (Glass Thin wall w/fil 1.5 mm 4 in, Word Precision Instruments, Inc.), mediante el uso de un estirador horizontal de pipetas programable (modelo P-87, Sutter Instrument Co.), y su punta se pulió en una microforja (Narishige Scientific Instruments, tipo MF-83). Una vez llenas con solución de pipeta (Fig. 1), el valor de la resistencia fluctuó entre 3 y 5 M $\Omega$ . El potencial de unión que aparece por la diferente movilidad de los iones en la interface de dos soluciones con diferente composición (Brockris y Reddy, 1970), se corrigió

electrónicamente. La resistencia en serie se mantiene en un rango entre 8-10 MΩ. Se compensó alrededor del 80% de las resistencia en serie.

Los protocolos de estimulación utilizados para el registro de  $I_{Ca}$  fueron los siguientes: Se aplicó un prepulso a -50 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV, con una duración de 300 ms, seguido de pulsos despolarizantes desde -50 mV con incrementos de 5 mV con una duración de 75 ms. El prepulso se aplicó para inactivar  $I_{Na}$ . Los prepulsos aplicados no inactivan la  $I_{Ca}$  debido a que el prepulso que se aplica es en un rango de voltaje donde no se activa este tipo de corriente.

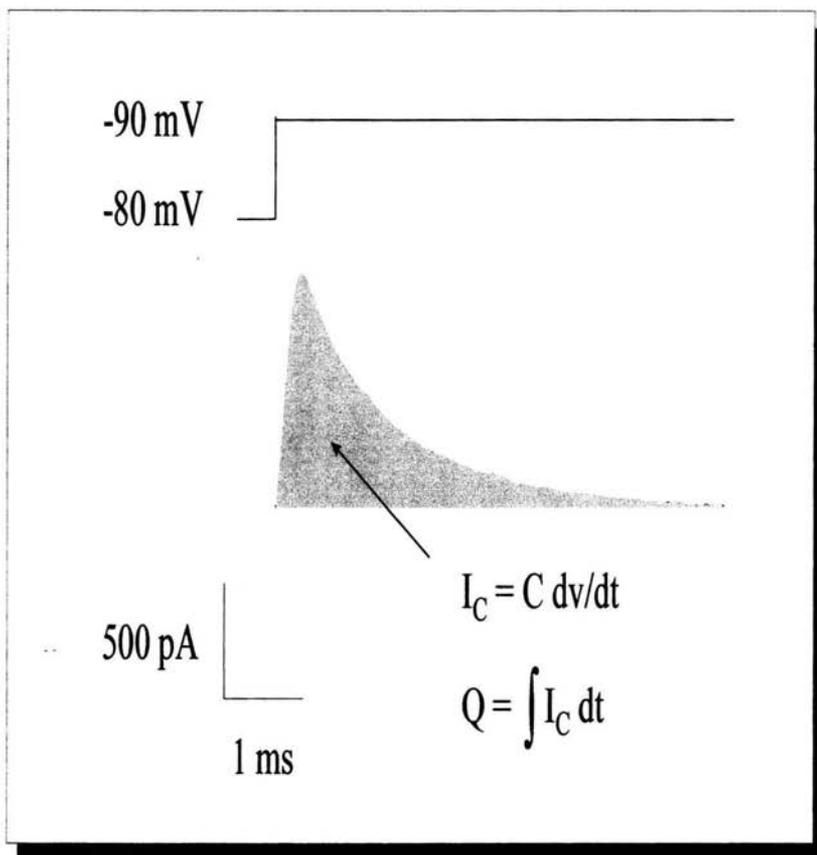
La amplitud de  $I_{Ca}$  se graficó midiendo el valor máximo de la corriente obtenida con los pulsos despolarizantes en función del potencial del pulso. La densidad de la corriente se graficó después de normalizar la amplitud de la corriente por el área celular.

### 5.2.3. Medición del Area Celular.

A fin de expresar  $I_{Ca}$  como densidad de corriente, eliminando el tamaño celular como variable, se normalizó la amplitud de  $I_{Ca}$  por la cantidad de membrana por miocito. La cuantificación de la membrana celular se obtuvo midiendo la capacidad eléctrica membranal de acuerdo a las siguiente relación:

$$I_c = C \frac{dV}{dt} \quad (3)$$

donde  $I_c$  es la corriente capacitiva;  $C$  es la capacidad de la membrana multiplicada por la derivada del voltaje con respecto al tiempo ( $dV/dt$ ). El protocolo para el registro de  $I_c$  consistió en un pulso despolarizante de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV, de tal forma que lo único que se obtuvo fué el componente lineal de la corriente (excluyendo el componente iónico). Ya que  $C$  es proporcional al área celular y conociendo que la capacidad de todas las biomembranas es de  $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$  podemos llevar a cabo esta relación y obtener el área de la célula (figura 2).



**Figura 2. Medición del área total de membrana.** El área de membrana se calculó a partir de la capacidad eléctrica de la membrana celular. Para ello se utilizó un pulso de 10 mV durante 30 ms como se muestra en la parte superior de la figura. La capacidad de la membrana se obtuvo integrando la corriente capacitiva resultante.

La amplitud de la corriente se expresó en nA, en tanto que la densidad de la corriente en pA/pF.

#### **5.2.4. Determinación de la Dependencia de Voltaje de $I_{Ca}$ en el Estado Estacionario.**

La dependencia de voltaje de los procesos de activación e inactivación se evaluó mediante la medición de los parámetros definidos por Hodgkin y Huxley,  $d_\infty$  y  $f_\infty$ , respectivamente.

#### 5.2.4.1. Inactivación.

Para evaluar la inactivación, se registró  $I_{Ca}$  con un protocolo de doble pulso (Raymond et al., 1994; Wetzel et al., 1993). Este protocolo consistió en la aplicación de un pulso condicionante a diferentes potenciales (entre -60 y -10 mV, con incrementos de 10 mV), a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV, y con una duración de 100 ms, seguido de un pulso despolarizante de prueba a -10 mV, con una duración de 25 ms. A fin de cuantificar el parámetro  $f_{\infty}$ , se midió la amplitud del pico de  $I_{Ca}$  durante el pulso de prueba, su valor se normalizó a la máxima obtenida sin prepulso y se graficó en función al potencial del prepulso. La fracción resultante indica la proporción de canales no inactivados a cada potencial. Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación de inactivación propuesta por HH:

$$f_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_h}{k_f}\right)} \quad (4)$$

En donde  $V$  corresponde al potencial de membrana del pulso despolarizante, y la dependencia de voltaje se deriva del valor de  $V_h$  que es el potencial medio de la curva y  $k_f$  corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva.

#### 5.2.4.2. Activación.

La curva de activación se obtuvo por dos métodos: uno farmacológico y otro analítico. El método farmacológico consistió en medir la corriente de cola de  $I_{Ca}$  ( $I_{Catail}$ ) antes y después de la aplicación de 100  $\mu$ M de  $Cd^{2+}$ , bloqueador selectivo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo-L.  $I_{Catail}$  se midió al momento de repolarizar la membrana desde un potencial en donde se logra la máxima activación de  $I_{Ca}$ , de manera que generamos una mayor fuerza electromotriz con los canales abiertos durante el pulso despolarizante y que no se inactivaron por la corta duración del pulso aplicado. El pulso que se aplicó para la obtención de esta corriente de cola fue a 10 mV, a partir de un potencial de prepulso de -50 mV (para inactivar  $I_{Na}$ ), con una duración de 10 ms. La corriente así medida tiene dos componentes uno capacitivo y otro iónico ( $I_{Catail}$ ). La aplicación del  $Cd^{2+}$  bloquea el componente iónico dejando sólo el capacitivo. De tal manera que restando los trazos

registrados antes y después de la aplicación de  $\text{Cd}^{2+}$  se obtiene una corriente que corresponde exclusivamente a  $I_{\text{Ca}}$ . Al corte del pulso se observa entonces  $I_{\text{Catail}}$  que corresponde a la fracción de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  abiertos a cada potencial despolarizante. Con el fin de medir la amplitud de la corriente exactamente al corte del pulso y eliminar la incertidumbre generada por la frecuencia de muestreo, se ajustó una función exponencial al decaimiento de la corriente y se extrapola al primer punto registrado durante la repolarización. Mediante la graficación de la amplitud de  $I_{\text{Catail}}$  normalizada a la máxima, en función al potencial del pulso despolarizante se obtiene la curva de activación en el estado estacionario, es decir el parámetro  $d_{\infty}$ .

El método analítico se basó en la medición de la conductancia cuerda ( $g_{\text{ICa}}$ ) a partir de la amplitud máxima de  $I_{\text{Ca}}$  ( $I_{\text{pico}}$ ) durante un pulso despolarizante.  $g_{\text{ICa}}$  se calculó dividiendo  $I_{\text{pico}}$  entre la fuerza electromotriz

$$g_{\text{ICa}} = \frac{I_{\text{pico}}}{(E_{\text{Ca}} - E_{\text{rev}})} \quad (5)$$

$g_{\text{ICa}}$  corresponde a trazar una cuerda desde el punto de inversión de la corriente a los distintos puntos, y su pendiente se grafica como función del potencial de membrana.

Los resultados obtenidos con ambos métodos se ajustaron con la expresión propuesta por Hodgkin y Huxley para la activación estacionaria:

$$d_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_h - V}{k_d}\right)} \quad (6)$$

En donde  $V$  corresponde al potencial de membrana del pulso despolarizante, y la dependencia de voltaje se deriva del valor de  $V_h$  que es el potencial medio de la curva y  $k_d$  corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva.

#### 5.2.4.3. Corriente Estacionaria o de Ventana.

La fracción de canales que determina la amplitud de  $I_{Ca}$  estacionaria observada al final de un pulso despolarizante, corresponde a los canales activados a ese potencial resistentes a la inactivación. Esta corriente se le denomina corriente de ventana ( $I_w$ ), y su amplitud a cada potencial se obtuvo multiplicándolos parámetros de activación e inactivación en el estado estacionario, con la siguiente expresión:

$$I_w = (d_{\infty})^a (f_{\infty})^b \quad (7)$$

en donde el valor de los exponentes  $a$  y  $b$  fueron determinados empíricamente. En nuestro caso el valor de ambos fue de 1, a diferencia del modelo original de HH en donde el valor de  $a$  es de 3.

#### 5.3. Análisis de Datos.

$I_{Ca}$  se registró en línea tanto en el osciloscopio como en una computadora personal 386, compatible con IBM, con un procesador de 25 MHz, en donde se almacenó para posteriormente analizarse. El almacenamiento definitivo se realizó en discos magnéticos. Tanto la generación de los diferentes protocolos de pulsos como la adquisición se llevaron a cabo mediante el uso de software disponible comercialmente (P Clamp, V5, Axon Instruments Inc.). El valor de la corriente de membrana se expresó en densidad por área de la membrana ( $\mu A/cm^2$ ) o por capacidad ( $nA/nF$ ).

La señal de la corriente se digitalizó a 4 kHz con un convertidor de 12 bits D/A - A/D (TLM, Labmaster) la señal se filtró a través de un filtro pasa-bajos Bessel de un 8 polos a una frecuencia de 2 kHz. Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar.

#### 5.4. Soluciones Experimentales (expresadas en mM).

##### 5.4.1. Aislamiento de Miocitos.

	Tyrode Normal	Tyrode sin $\text{Ca}^{2+}$ añadido	Solución Enzimática	Solución de Lavado
NaCl	140	140	140	140
KCl	5	5	5	5
MgCl <sub>2</sub>	1	1	1	1
HEPES	10	10	10	10
Glucosa	10	10	10	10
CaCl <sub>2</sub>	2		20 $\mu\text{M}$	200 $\mu\text{M}$
Colagenaza (Sigma)	Tipo-II	-	0.4 mg/ml	-
Albúmina	-	-	-	1 mg/ml
pH (NaOH)	7.4	7.4	7.4	7.4

##### 5.4.2. Solución C o de alto $\text{K}^+$ .

KCl	5
K-glutamato	120
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
EGTA	0.1
Glucosa	10
pH (KOH)	7.4

**5.4.3. Solución para el Registro de  $I_{Ca}$**

NaCl	140
KCl	5
CaCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	1
Glucosa	10
HEPES-Na	10
pH (NaOH)	7.4

**5.4.4. Solución Interna o de Pipeta**

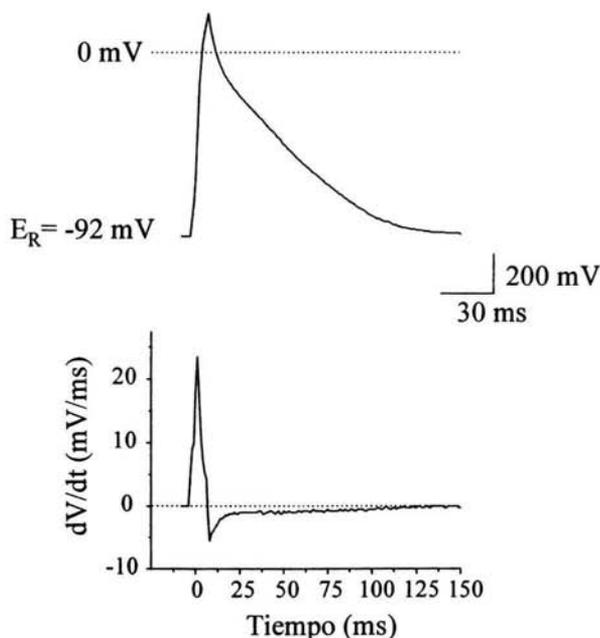
CsCl	140
MgCl <sub>2</sub>	1
MgATP	3
Glucosa	10
HEPES-Cs	10
EGTA	0.1
pH (CsOH)	7.4

## 6. R E S U L T A D O S

### 6.1 C A P I T U L O I

#### POTENCIAL DE ACCION.

Las características de  $I_{Ca}$  determinan muchos de los aspectos funcionales de la célula cardiaca, tanto en sus propiedades mecánicas como eléctricas. Entre estas últimas destaca la morfología del PA.- La figura 3 muestra un trazo representativo del PA registrado en miocitos cardiacos de rata adulta, con 2 mM de  $CaCl_2$  en la solución externa.



**Figura 3. Potencial de acción de miocitos ventriculares de rata adulta.** En la parte superior se muestra un PA registrado con la técnica de *patch clamp*, en su configuración de *whole cell*, en el modo de fijación de corriente. El potencial de reposo fue de  $-92$  mV y el potencial de inversión de  $19.8$  mV. En la parte inferior se muestra la derivada del potencial en función al tiempo, el cual alcanzó un valor máximo de  $23.4$  mV/ms.

Tal y como se ha descrito previamente (Cohen y Lederer, 1988; Kojima et al., 1990a), el PA de rata adulta muestra características muy particulares, entre las que

destaca la corta duración de su fase de meseta. Debido a esta característica, la duración del PA típicamente varía entre de 100 y 150 ms

De acuerdo a la figura 3, los parámetros que mostró el PA fueron:  $E_R = -92$  mV; sobretiro = +7.8 mV, duración del PA al 50% de la repolarización = 35 ms; duración del PA al 90% de la repolarización = 93 ms; y máxima  $dV/dt = 23.4$  mV/ms.

Los mecanismos iónicos responsables de esta morfología se explican por el gran predominio de las fuerzas repolarizantes mediada por diferentes corrientes de  $K^+$ , especialmente  $I_{TO}$  e  $I_{K1}$ . Debido a la abundancia y gran velocidad de activación de  $I_{TO}$ , la fase 1 de repolarización temprana es dominada por esta corriente, lo cual hace que el potencial de membrana se repolarice rápidamente. Por otra parte, la baja densidad de  $I_{Ca}$ , única corriente despolarizante durante la fase 2, impide el equilibrio de fuerzas, responsable de la fase de meseta típicamente observada en otras especies. Finalmente, cuando el potencial de membrana se encuentra entre -30 y -40 (alrededor del final de la fase 2),  $I_{K1}$  se activa para generar la fase 3, lo cual lleva el potencial de membrana hasta su valor de reposo.

En la parte inferior de la figura 3, se muestra la derivada del potencial con respecto al tiempo. Su valor máximo (23.4 mV/ms) refleja la activación de  $I_{Na}$  responsable de la fase 0. Una característica del PA en la rata es que la  $dV/dt$ , rápidamente cambia de signo y se mantiene en valores negativos mientras dura el PA.

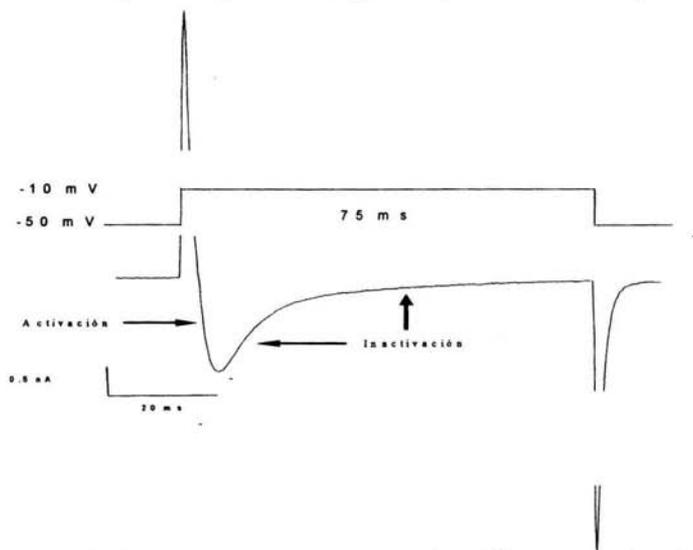
Como se mencionó anteriormente, una de las razones por las que la fase de meseta es tan pequeña en la rata es la baja densidad de  $I_{Ca}$ . Sin embargo, otros mecanismos podrían participar en tal fenómeno, como por ejemplo corrimiento hacia la izquierda de la dependencia de voltaje de  $I_{Ca}$ . A fin de evaluar estas posibilidades registramos  $I_{Ca}$  y medimos sus diferentes parámetros que la determinan, tanto en relación a su amplitud máxima como a su cinética y dependencia de voltaje.

## 6.2. C A P I T U L O II

### CURSO TEMPORAL DE $I_{Ca}$ .

Los factores que determinan en qué fase del PA participa una corriente iónica son fundamentalmente dos, a) su dependencia del voltaje y b) la velocidad con la que el canal responde a los cambios en el potencial de membrana. Estos factores se reflejan en el curso temporal que sigue una corriente registrada en un determinado potencial mediante fijación de voltaje.

El curso temporal de  $I_{Ca}$  registrada en presencia de 2 mM de  $Ca^{2+}$  externo y a temperatura ambiente, se muestra en la figura 4.  $I_{Ca}$  se registró mediante la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura 4. Este protocolo consistió en la aplicación de un prepulso a -50 mV, a partir de un potencial de mantenimiento (H.P. de -90 mV con el fin de inactivar  $I_{Na}$ . Posteriormente se aplicó un pulso de prueba a -10 mV, durante 75 ms. Con este protocolo fue posible registrar  $I_{Ca}$  en su máxima amplitud y durante suficiente tiempo como para evaluar por completo su curso temporal.



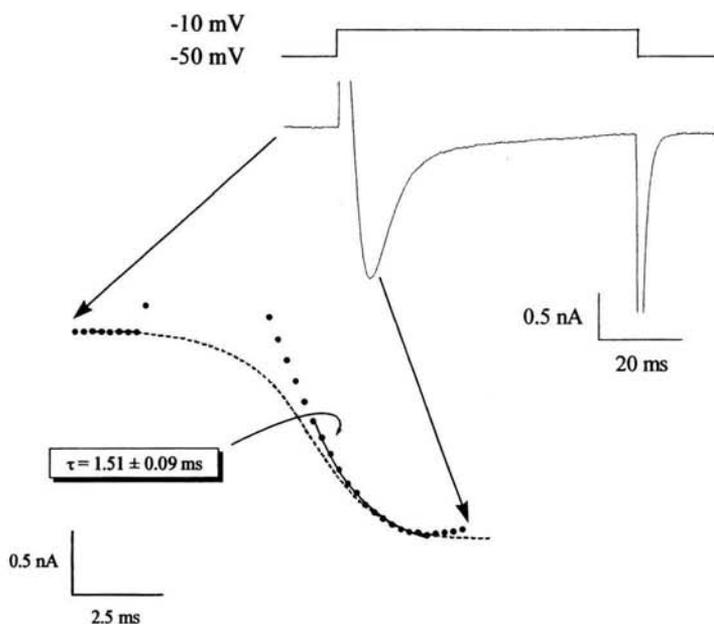
**Figura 4. Curso temporal de  $I_{Ca}$**   $I_{Ca}$  se registró en presencia de 2 mM de  $Ca^{2+}$  externo y mediante el uso del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. Las flechas indican las fases de activación y de inactivación.

El trazo de la figura 4 se muestra sin restar los componentes capacitivos, por lo que tanto

al inicio como al final del pulso existen dos eventos transitorios formados por: a) corriente capacitiva, b) corriente de compuerta, y c) corriente de cola de  $I_{Ca}$  (sólo al corte del pulso). Durante el pulso despolarizante  $I_{Ca}$  muestra dos componentes temporales predominantes: un componente de activación y otro de decaimiento (señalado con flechas). El pico de la corriente de  $Ca^{2+}$  se alcanzó a los 7 ms, en tanto que la fase de decaimiento no llegó a ser completa.

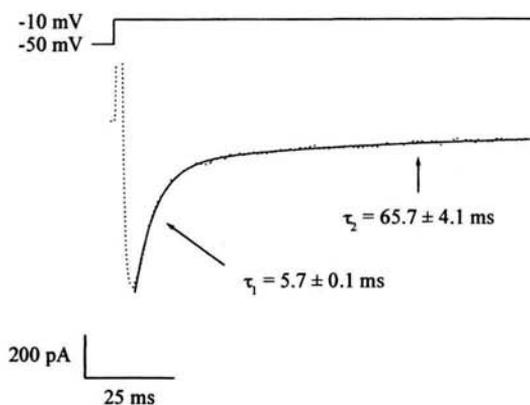
### 6.2.1. Fase de Activación de $I_{Ca}$

Para evaluar mejor el componente de activación de  $I_{Ca}$ , la escala de tiempo se expandió al inicio del trazo, como se observa en la parte inferior de la figura 5



**Figura 5. Activación de  $I_{Ca}$ .** En la parte inferior se muestra el componente de activación de  $I_{Ca}$  (círculos negros), desplegada en una base de tiempo expandida. El mejor ajuste de los datos experimentales (línea continua) se obtuvo cuando el  $\tau$  fue de 1.5 ms, para ello se utilizó la siguiente expresión  $A \times \exp. \{-(t-K)/\tau\} + C$ . Para fines de comparación, se muestra en línea discontinua el comportamiento de la activación en el caso de esquemas cinéticos complejos.

El proceso de activación mostró un curso temporal definido por una función monoexponencial (línea continua) con una constante de activación ( $\tau$ ) de  $\approx 1.5$  ms. Este tipo de comportamiento podría indicar la existencia de un sólo estado de cierre antes del estado abierto del canal. Alternativamente, se podría especular que existen varios estados de cierre previos, pero que el canal se activa a partir del estado de cierre inmediato al abierto, siendo la transición entre los estados previos, independiente del voltaje. Sin embargo, debido a la presencia de una corriente capacitiva al inicio del pulso de gran amplitud la cual se relaja después de varios milisegundos, es imposible concluir sobre el esquema cinético de activación. De hecho, la presencia de una activación sigmoide, (figura 5, línea discontinua) reflejo de la existencia de varios estados de cierre con transiciones dependientes de voltaje, es también posible.



**Figura 6-Decaimiento de  $I_{Ca}$ .**  $I_{Ca}$  (línea punteada) se registró mediante el pulso ilustrado en la parte superior, el cual tuvo una duración de 100 ms. La línea continua se generó ajustando los datos experimentales con la ecuación (8)

### 6.2.2. Fase de Inactivación de $I_{Ca}$

La figura 6 muestra el decaimiento de  $I_{Ca}$  cuando se registra con un pulso despolarizante a -10 mV, durante 100 ms. Tal decaimiento se caracterizó por presentar un curso temporal definido por un componente exponencial rápido ( $\tau_1 = 5.7$  ms) y otro lento ( $\tau_2 = 65.7$  ms). Esta cuantificación se obtuvo mediante el uso de la siguiente expresión:

$$I_{Ca} = 1 - \left( A_1 \exp \frac{-t}{\tau_1} + A_2 \exp \frac{-t}{\tau_2} + C \right) \quad (8)$$

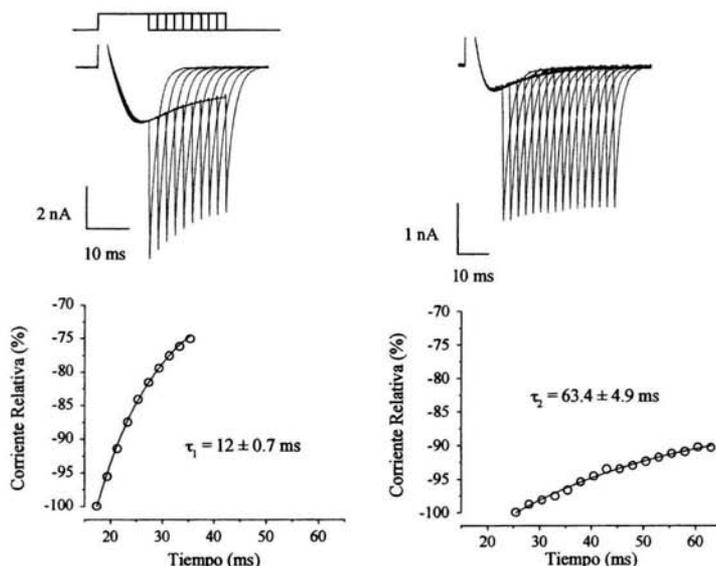
Las posibles explicaciones del decaimiento de  $I_{Ca}$  se basan en los siguientes mecanismos: a) disminución en la fuerza electromotriz por depleción de  $Ca^{2+}$  en el espacio tubular, o por acumulación de  $Ca^{2+}$  en el mioplasma (Almers et al., 1981); b) existencia de un proceso de inactivación dependiente de  $Ca^{2+}$  (Brehm y Eckert, 1978; Tillotson, 1979) y/o de voltaje (Cota et al., 1984; Mejía-Alvarez et al., 1991); y c) activación de una corriente saliente.

Con el fin de explorar el mecanismo responsable del decaimiento de  $I_{Ca}$  se evaluó la corriente envolvente de  $I_{Ca}$ . Para tal fin se utilizó un protocolo de pulsos consistente en mantener el potencial en -50 mV, y dar un pulso despolarizante a -10 mV con diferentes duraciones, repolarizando la membrana a -50 mV. El resultado de tales experimentos se ilustra en la figura 7.

En estas condiciones, el pico de la corriente al corte del pulso disminuye conforme aumenta la duración del pulso despolarizante, reflejando el componente debido a  $I_{Ca-Tail}$ , quien a su vez resulta de la fracción de  $I_{Ca}$  que aún no decae. En la parte inferior de la figura 7 se grafica la amplitud de esta corriente al corte del pulso, tanto para el componente rápido (izquierda, figura 7) como para el lento (derecha, figura 7), en función a la duración del pulso de prueba. El ajuste de los datos se realizó con una función exponencial simple para ambos componentes, con una constante de decaimiento de  $12 \pm 0.7$  ms para el componente rápido y de  $63.4 \pm 4.9$  ms para el componente lento.

La constante de decaimiento de ambos componentes medidos a partir de la corriente envolvente de  $I_{Ca}$  fue muy similar a la obtenida directamente del decaimiento de  $I_{Ca}$  (figura 6). Debido a que la medición de la corriente envolvente refleja directamente el decaimiento de  $I_{Ca}$ , (la fuerza electromotriz para otras corrientes se mantiene sin cambio),

y a la gran similitud en las constantes de decaimiento medidas con los dos métodos, concluimos que el decaimiento observado resulta de un verdadero decaimiento de  $I_{Ca}$ .



**Figura 7.- Corriente envolvente de  $I_{Ca}$ .** Con el fin de evaluar el decaimiento de  $I_{Ca}$  sin la interferencia de otra corriente se midió la envolvente de  $I_{Ca}$ . En la parte superior, se muestran dos familias de trazos que ilustran los componentes rápido (izquierda, 10 trazos) y lento (derecha, 16 trazos) del decaimiento de  $I_{Ca}$ . En la parte inferior, se muestra la amplitud de la corriente medida al corte del pulso, normalizada a la máxima y graficada en función a la duración del pulso.

El hecho de que la cinética de decaimiento de  $I_{Ca}$  observada por nosotros mostró un curso temporal muy parecido al que se ha descrito previamente a nivel unitario para el canal de  $Ca^{2+}$  tipo L cardiaco, permite suponer que tal decaimiento corresponde a una verdadera inactivación del canal, ya sea dependiente de  $Ca^{2+}$  y/ de voltaje.

## 6.3. C A P I T U L O III

### PROPIEDADES DE PERMEABILIDAD DE $I_{Ca}$ .

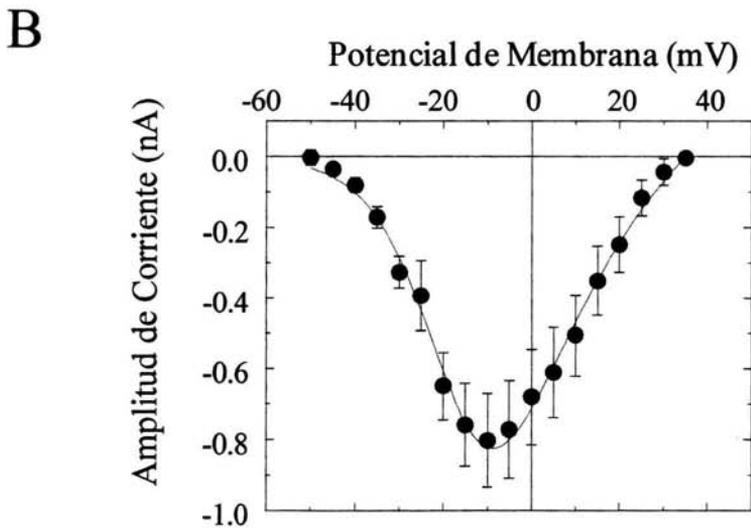
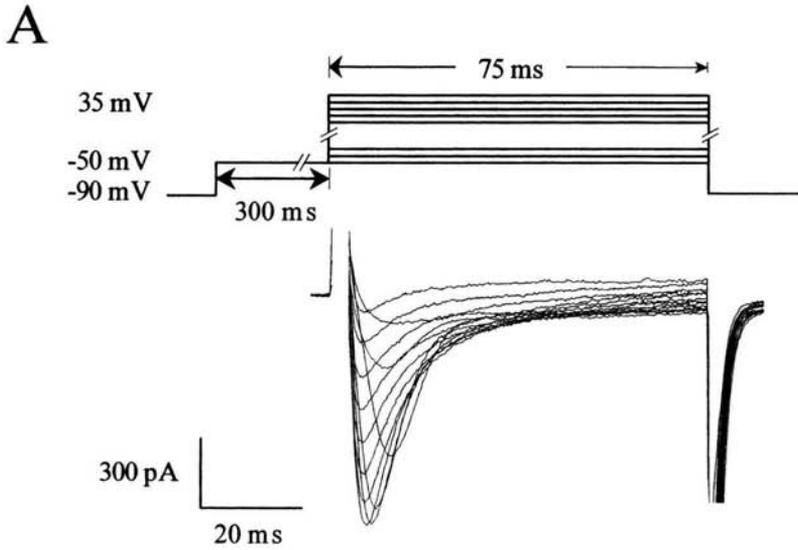
#### 6.3.1. Amplitud de $I_{Ca}$ en Función del $V_m$

Para ilustrar la dependencia de voltaje de la amplitud de  $I_{Ca}$  graficamos la relación corriente-voltaje (I-V) como se muestra en la figura 8.  $I_{Ca}$  se registró mediante la aplicación de un protocolo como el que se muestra en la parte superior de la figura, el cual consistió en la aplicación de un prepulso con una duración de 300 ms desde -90 mV a -50 mV para inactivar  $I_{Na}$ . Al final de este prepulso se aplicaron pulsos despolarizantes a distintos potenciales con una duración de 75 ms. De esta forma se obtuvo una familia de trazos como la que se muestra en la parte inferior del panel A de la figura 8.

La relación I-V se obtuvo graficando la amplitud máxima de  $I_{Ca}$  en función del potencial del pulso (panel B, figura 8). Tal relación mostró un umbral de activación de ~ -45 mV, una amplitud máxima de  $802.7 \pm 131.6$  pA a -10 mV, y un potencial de inversión aparente de ~ 35 mV. Con el fin de conocer los parámetros que definen la activación y permeabilidad de  $I_{Ca}$  en función al voltaje, se ajustaron los datos experimentales con la siguiente expresión:

$$I_{Ca} = \left\{ \frac{1}{V - V_m} \right\} \cdot \left\{ [Ca^{2+}]_o \right\} \cdot 2P_{Ca} \frac{zVF^2}{RT} \cdot \left\{ \frac{\exp\left[\frac{zF(V - E_{Ca})}{RT}\right] - 1}{\exp\left(\frac{zVF}{RT}\right) - 1} \right\} \quad (9)$$

Esta expresión resulta de la convolución de una función de Boltzman y la ecuación de corriente de campo constante. El primer término (función de Boltzman) indica la activación de  $I_{Ca}$  en función al potencial, en donde  $V_m$  (potencial al cual se alcanza la mitad de la activación) tuvo un valor de -16 mV, y  $k_m$  (pendiente de la región lineal de dicha activación) fue de 7.38 mV. El segundo y tercer términos definen los cambios de permeabilidad en función al voltaje, y en donde  $[Ca^{2+}]_o$  fue de 2 mM,  $P_{Ca}$  (máxima permeabilidad para el  $Ca^{2+}$ ) fue de  $5.5 \times 10^{-5}$  cm/s,  $z$  (carga del  $Ca^{2+}$ ) fue de 2



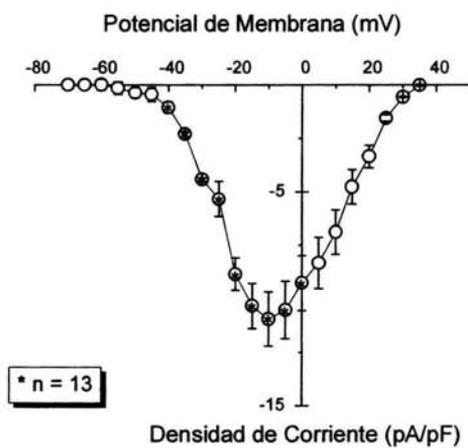
**Figura 8.- Amplitud de  $I_{Ca}$  en función del voltaje.** A. Familia de trazos de  $I_{Ca}$  registrada a diferentes potenciales con el protocolo que se muestra en la parte superior.  $I_{Ca}$  se registró en presencia de 2 mM de  $Ca^{2+}$  en la solución extracelular y a temperatura cambiante. Por fines de claridad se ha omitido la región del trazo durante el prepulso a -50 mV que incluye  $I_{Na}$ . B. Relación corriente-voltaje de  $I_{Ca}$  medida en su valor de máxima amplitud. Los datos son el promedio de 13 células  $\pm$  S.E.M. La línea continua se generó mediante el ajuste de los datos con la ecuación (9).

mM,  $E_{Ca}$  de 35 mV, y  $R$ ,  $T$ , y  $F$  tuvieron sus típicos valores termodinámicos.

Estos resultados indican que la amplitud de  $I_{Ca}$  es dependiente de voltaje, ya que a medida que el voltaje se vuelve menos negativo por arriba del valor umbral,  $I_{Ca}$  alcanza su valor máximo (a -10 mV), después del cual  $I_{Ca}$  se comportó en forma ohmica, es decir, conforme el potencial se acercó al valor de inversión la fuerza electromotriz disminuyó con el resultante decaimiento lineal en la amplitud de  $I_{Ca}$ .

### **6.3.2. Densidad de $I_{Ca}$**

Para cuantificar la densidad de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través del sarcolema (densidad de  $I_{Ca}$ ) normalizamos el valor de la amplitud de la corriente por el área total de membrana. El resultado se graficó como relación de densidad de corriente-voltaje, como se muestra la figura 9. Para cuantificar el área celular total medimos la capacidad eléctrica de la membrana mediante el registro de la corriente capacitiva obtenida con un pulso despolarizante de 10 mV de amplitud a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV (ver sección de Material y Métodos). De esta manera determinamos que la superficie total de la membrana fue de  $88 \pm 11.4 \mu\text{cm}^2$  ( $n = 22$ ). Así, una vez conocida el área celular normalizamos la amplitud de  $I_{Ca}$  y la densidad resultante se graficó en función del potencial de membrana. Como se observa en la figura 9, el valor de densidad máxima fue de  $11 \pm 1.8 \text{ pA/pF}$ , y como era de esperarse las propiedades morfológicas y de dependencia de voltaje de la curva no cambiaron con respecto a la mostrada en la figura 8



**Figura 9. Relación corriente-voltaje normalizada por unidad de área (densidad de la corriente).** Esta figura se construyó a partir de la curva I-V de amplitud normalizada por el área celular. (n=13)

## 6.4. C A P I T U L O   I V

### CINETICA DE $I_{Ca}$ EN EL ESTADO ESTACIONARIO

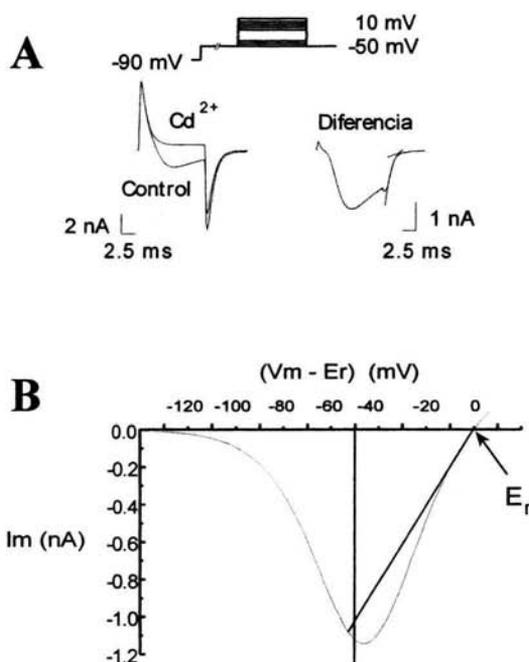
El papel funcional de  $I_{Ca}$  en la célula miocárdica esta determinado por la propiedades de permeabilidad, cinética y regulación del canal de  $Ca^{2+}$  tipo L. Como se ha mostrado a lo largo de la presente tesis, muchos de los aspectos funcionales de  $I_{Ca}$  dependen fuertemente del potencial de membrana. Esto es particularmente relevante al considerar que durante el PA, el potencial de membrana fluctúa continuamente en un amplio rango de valores. En este capítulo se describirá la dependencia de voltaje de los parámetros cinéticos más importantes de  $I_{Ca}$  en el estado estacionario.

De acuerdo con la propuesta de Hodgkin y Huxley, el estudio de la activación e inactivación en el estado estacionario permite evaluar la dependencia de voltaje de los parámetros  $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$ , respectivamente, los cuales controlan estos procesos. El estado estacionario se logra cuando el potencial de membrana se mantiene constante durante un tiempo suficientemente largo como para eliminar los componentes temporales de una corriente iónica. De esta manera el factor tiempo resulta eliminado.

#### *6.4.1. Activación de $I_{Ca}$*

La manera más directa de evaluar la dependencia de voltaje de  $d_{\infty}$  es la medición de  $I_{Ca-Tail}$ , la cual se obtiene al repolarizar la membrana después de un pulso despolarizante muy breve a diferentes potenciales. Con ello se logra activar progresivamente un mayor número de canales, los cuales debido a la corta duración del pulso prácticamente no se inactivan. Al repolarizar la membrana se aumenta súbitamente la fuerza electromotriz lo suficiente como para generar una corriente entrante (corriente de cola) que permite cuantificar dicha fracción de canales. Debido a que la probabilidad de apertura del canal de  $Ca^{2+}$  aumenta conforme se despolariza la membrana, dicha fracción muestra un comportamiento sigmoidal con respecto al voltaje, revelando así el parámetro  $d_{\infty}$ . Debido a que en nuestras condiciones experimentales no restamos los

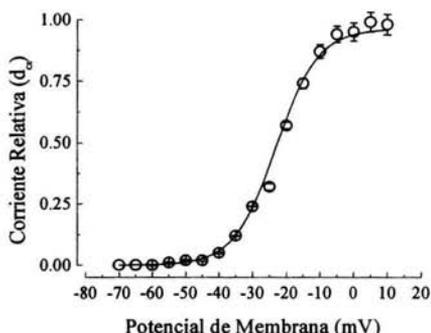
componentes lineales, la corriente de membrana se encuentra compuesta fundamentalmente por corriente capacitiva y la propia  $I_{Ca}$ . Con el fin de disecar  $I_{Ca}$  registramos la corriente antes y después de la adición en la solución externa de  $100 \mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , bloqueador selectivo del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. La diferencia que resulta de restar los trazos en ambas condiciones corresponde enteramente a  $I_{Ca}$ . El resultado de uno de estos experimentos se muestra en el panel A de la figura 10.



**Figura 10. Medición de la activación estacionaria de  $I_{Ca}$ .** A. Corriente de membrana registrada con el protocolo ilustrado en la parte superior, antes y después de la adición de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  (el trazo ilustrado se obtuvo a  $-10 \text{ mV}$ ). A la derecha se muestra  $I_{Ca}$  que resulta de restar los trazos antes y después de  $\text{Cd}^{2+}$  (izquierda). El valor máximo de  $I_{Ca-Tail}$  se cuantificó mediante el ajuste con dos exponenciales y la extrapolación del componente rápido. B. Conductancia cuerda (recta) medida a partir de la relación I-V para  $I_{Ca}$  (curva en forma de campana), y graficada en función a la fuerza electromotriz.

Con el fin de estimar la amplitud real de  $I_{Ca-Tail}$  se ajustó la relajación de  $I_{Ca}$  durante la repolarización con una función exponencial doble. El componente rápido se extrapoló al primer punto obtenido al repolarizar la membrana, el cual correspondió al valor máximo de  $I_{Ca}$  en este potencial (corriente de cola). Dicho valor se normalizó al máximo obtenido a diferentes potenciales y se graficó en función del potencial del pulso

despolarizante. El resultado se ilustra en la figura 11.



**Figura 11.-  $d_{\infty}$  de  $I_{Ca}$ .** Los círculos indican la amplitud de la corriente de  $I_{Ca-Trai}$  normalizada con respecto a la máxima. La curva de activación (línea continua) se obtuvo con la ecuación (6), la cual se presentó un  $V_h$  de -23.1 mV y una  $k_d$  de 6.2 mV.

Los datos se ajustaron mediante el uso de la ecuación (6) de HH para la activación:

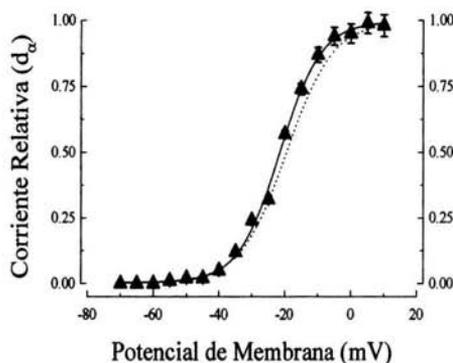
$$d_{\infty} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_h - V}{k_d}\right)} \quad (6)$$

en donde  $V_h$  representa el valor medio de potencial, y  $k_d$  el valor de la pendiente para la parte lineal. Como se observa en la figura 11, los datos experimentales se describieron cuando  $V_h$  fue -23.1 mV y  $k$  6.2 mV.

Con el fin de corroborar la exactitud del método del  $Cd^{2+}$ ,  $d_{\infty}$  también se evaluó mediante la medición de la conductancia cuerda (panel B, figura 10). Al graficar la pendiente normalizada de la conductancia cuerda en función al voltaje, se obtuvo la fracción de canales abiertos a cada potencial de membrana, lo cual reflejó el valor de  $d_{\infty}$ . El resultado también se ajustó con la ecuación (6), la cual se caracterizó por presentar un  $V_h$  de -19.8 mV y una  $k_d$  de 6.0 mV. El resultado se muestra en la figura 12 (línea discontinua) en comparación con la curva obtenida con el método del  $Cd^{2+}$ .

Independientemente del método utilizado,  $d_{\infty}$  desplegó un comportamiento muy similar, el cual se caracterizó por un umbral de activación de  $\sim -40$  mV, un  $V_h$  de  $\sim -20$  mV, y una pendiente de  $\sim 6$  mV. Más aún, estos valores reflejan un comportamiento muy

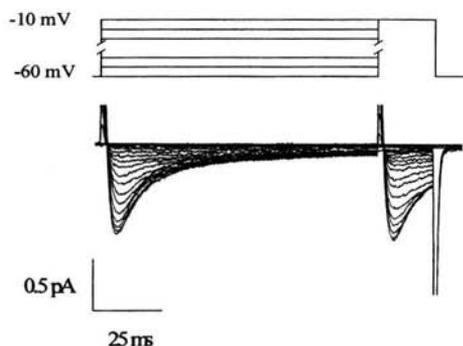
similar al observado en la relación I-V que se muestra en la figura 8B, y con el que se derivó a partir de la ecuación (9).



**Figura: 12. Comparación de  $d_{Ca}$  evaluado mediante dos métodos.** Los triángulos indican los datos experimentales obtenidos mediante el uso de  $Cd^{2+}$ . El ajuste (línea continua) de los datos se realizó mediante el uso de la ecuación (6). La curva discontinua indica la activación medida a partir de la conductancia cuerda y ajustada con la misma ecuación.

### ***Inactivación de $I_{Ca}$***

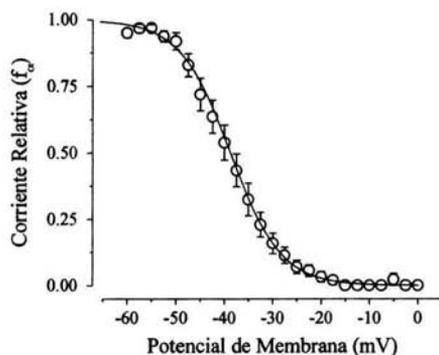
Para el estudio del componente de inactivación estacionaria, se registró  $I_{Ca}$  mediante el uso de un protocolo conocido como de doble pulso. La figura 13 muestra el resultado de uno de estos experimentos.



**Figura 13. Inactivación de  $I_{Ca}$  registrada con el protocolo de doble pulso.** Familia de trazos de  $I_{Ca}$  registrada con 2 mM de  $Ca^{2+}$  externo y mediante el uso del protocolo indicado en la parte superior. La duración del prepulso fue de 100 ms y la del pulso de prueba de 25 ms.

El protocolo de doble pulso consistió en la aplicación de prepulsos despolarizantes a distintos voltajes (desde -60 hasta -10 mV, con intervalos de 10 mV), con una duración de 100 ms, a partir de un potencial de mantenimiento de -60 mV, y seguidos de un pulso de prueba a -10 mV, durante 25 ms. La duración del prepulso se prolongó con la finalidad de permitir la inactivación de la fracción de canales activados a distintos potenciales. Cada trazo de  $I_{Ca}$  mostró dos componentes de activación secuencial, cada uno correspondiente a cada despolarización (uno durante el prepulso y otro durante el pulso de prueba). Cuando el prepulso no fue suficiente como para activar  $I_{Ca}$  (-60 mV),  $I_{Ca}$  desplegó su máxima amplitud durante el pulso de prueba. A medida que los pulsos condicionantes se hicieron más positivos una fracción progresivamente mayor de canales se activó, y debido a la duración del prepulso se favoreció su inactivación. Como consecuencia, la fracción de canales activables restante fue menor durante el pulso de prueba, y por lo tanto el pico de  $I_{Ca}$  disminuyó. Por el contrario, cuando durante el prepulso  $I_{Ca}$  logró su máxima amplitud, la amplitud de  $I_{Ca}$  fue mínima durante el pulso de prueba. Una observación interesante es que la amplitud de  $I_{Ca}$  durante el pulso de prueba nunca fue de cero, aún cuando durante el prepulso se obtuvo la máxima activación de  $I_{Ca}$ . Lo cual sugiere la existencia de un componente de  $I_{Ca}$  resistente a la inactivación.

El parámetro  $f_{\infty}$  se obtuvo midiendo la amplitud máxima de  $I_{Ca}$  obtenida durante el pulso a -10 mV, normalizándola al valor máximo de  $I_{Ca}$  obtenida con un prepulso a -60 mV, y graficándola en función del potencial del prepulso. En la figura 14 se muestra el resultado de tal análisis.



**Figura 14.**  $f_\infty$  de  $I_{Ca}$ . Los círculos representan el promedio de 8 experimentos, mientras que la línea continua se generó ajustando los datos con la ecuación (4). El mejor ajuste se obtuvo cuando  $V_h = -38.8$  mV y una  $k_f = 5.2$  mV.

El ajuste de los datos experimentales se realizó mediante la expresión propuesta por HH para la inactivación durante el estado estacionario:

$$f_\infty = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V - V_h}{k_f}\right)} \quad (4)$$

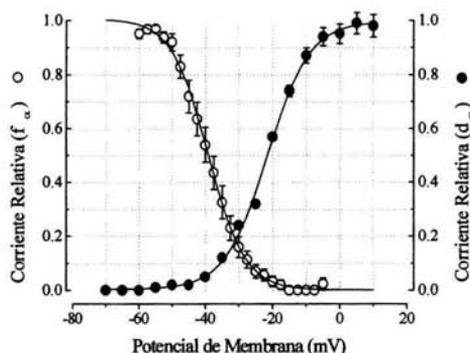
en donde  $V$  corresponde al potencial de membrana del pulso despolarizante, y la dependencia de voltaje se deriva del valor de  $V_h$  que es el potencial medio de la curva y  $k_f$  corresponde a la pendiente de la parte lineal de la curva.

Como se muestra en la figura 14, el resultado es una curva que varía entre 0 a 1, indicando la fracción de canales activables a cada potencial desde donde se activa  $I_{Ca}$ . El comportamiento de  $f_\infty$  sugiere que esta fracción de canales disminuye conforme el potencial del prepulso se hace menos negativo. De acuerdo a la ecuación (4),  $f_\infty$  presenta un  $V_h$  de  $-38.8$  mV y una  $k_f$  de  $5.2$  mV. Esta curva describe un comportamiento de Boltzman, lo que indica la transición entre dos estados, en este caso entre un estado activable a otro inactivado.

### **Corriente de Ventana y su Relación con el Componente Estacionario de $I_{Ca}$**

Como se mencionó anteriormente, una de las observaciones más interesantes en esta tesis fue que cuando se registró  $I_{Ca}$  con pulsos despolarizantes suficientemente largos se observó que su decaimiento fue incompleto. Por el contrario, la amplitud de  $I_{Ca}$  se estaciona en un valor pedestal ( $I_{Ca-SS}$ ). Intuitivamente, uno podría suponer que durante el PA este nivel de corriente debería mantenerse activo suficiente tiempo como para generar una entrada de  $Ca^{2+}$  importante; insidiendo de esta manera en las propiedades contráctiles de la célula miocárdica. A continuación se describen las maniobras realizadas con el fin de estudiar las propiedades de  $I_{Ca-SS}$ .

En la figura 15 se muestran sobrepuestos los dos parámetros que definen la dependencia del voltaje en el estado estacionario de  $I_{Ca}$ . La región en donde  $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$  se sobreponen se conoce como corriente de ventana ( $I_{Ca-Win}$ ), e indica la activación de una fracción de  $I_{Ca}$  que es resistente a la inactivación. Como se observa en la figura 15, el valor máximo se encuentra en  $-33.6$  mV, con una amplitud de  $\sim 0.18$ . El valor del potencial umbral de activación y el de decaimiento de  $I_{Ca}$  a cero, no se puede derivar directamente de los resultados mostrados en la figura 15, ya que la interacción de los dos parámetros modifica tales valores.



**Figura 15. Dependencia del voltaje de  $I_{Ca-Win}$ .** Esta corriente resulta de la activación de una fracción de  $I_{Ca}$  que no se inactiva.  $I_{Ca-Win}$  se muestra como el área de sobreposición de las curvas  $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$ . Su valor máximo fue de 0.18 y se centró en  $-33.6$  mV.

Con el fin de cuantificar la fracción de canales responsable de  $I_{Ca-Win}$ , se obtuvo el producto de los parámetros  $d_\infty$  y  $f_\infty$ , los cuales definen la dependencia de voltaje de la cinética estacionaria de  $I_{Ca}$ .

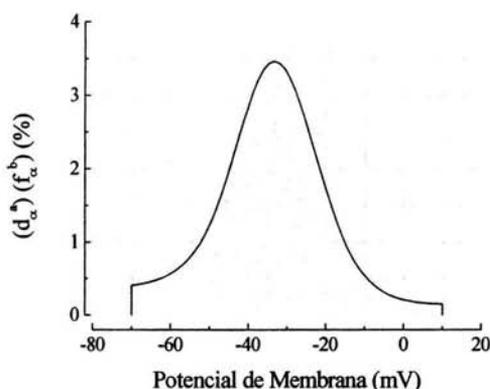
De acuerdo con la expresión general de HH para la corriente de membrana dada por la ecuación (2),

$$I_m = C_m \frac{dV}{dt} + m^3 h g_{Na} (E - E_{Na}) + n^4 g_K (E - E_K) + g_l (E - E_l) \quad (2)$$

es posible definir la dependencia de voltaje de las propiedades cinéticas de  $I_{Na}$  e  $I_K$ . Para el caso de  $I_{Ca}$ , y con base en nuestros resultados, dicha expresión se modifica para generar la siguiente ecuación:

$$I_{Ca} = d^1 f^1 g_{Ca} (E - E_{Ca}) \quad (10)$$

en donde  $g_{Ca}$  representa la conductancia máxima para el  $Ca^{2+}$ . La principal diferencia con la ecuación (2), es el valor del exponente del parámetro de activación ( $m^3$ , para  $I_{Na}$ , y  $n^4$  para  $I_K$ ), ya que para  $I_{Ca}$  fue igual a 1. Con base en lo anterior, la fracción de canales responsable de  $I_{Ca-Win}$  se obtuvo directamente del producto  $d_\infty$  y  $f_\infty$ , tal y como se muestra en la figura 16.

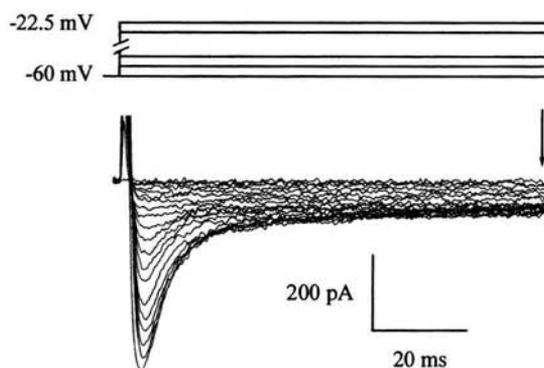


**Figura 16. Dependencia del voltaje de la fracción de canales responsables de  $I_{Ca-Win}$ .** Esta fracción se obtuvo del producto de los parámetros de activación e inactivación en el estado estacionario ( $d_\infty \times f_\infty$ ). La fracción máxima fue del 3.5% y se centró en -33.6 mV.

En esta figura se observa que la amplitud obtenida con el producto de  $d_\infty$  y  $f_\infty$  es distinta de la que se observa por la simple sobreposición de ambos (figura 15,  $I_{Ca-Win}$ ). Por

lo tanto, la fracción de canales responsable de  $I_{Ca-win}$  muestra un valor máximo de 3.5% a  $-33.6$  mV, un umbral de activación significativamente más negativo que el umbral de activación del componente transitorio de  $I_{Ca}$ , y decae a valores mayores que  $+10$  mV. Es interesante señalar que aún a mayores potenciales, el valor de la fracción de canales abiertos en el estado estacionario se acercó asintóticamente a cero. Lo que sugiere que aún a potenciales cercanos al de reposo es posible que exista cierta actividad del canal.

De acuerdo con las anteriores consideraciones, es posible concluir que  $I_{Ca-win}$  determina el componente estacionario de  $I_{Ca}$ , y que por lo tanto, durante un pulso despolarizante en condiciones de fijación de voltaje  $I_{Ca-ss}$  deberá comportarse tal y como lo predice  $I_{Ca-win}$ , pues al final de cuentas es la misma corriente. Con el fin de evaluar la precisión de tales predicciones se cuantificó la relación I-V de  $I_{Ca-ss}$ . El resultado se muestra en las figuras 17 y 18.

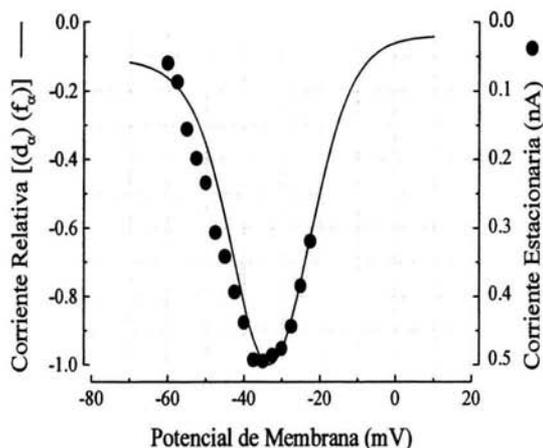


**Figura 17. Componente estacionario de  $I_{Ca}$ .**  $I_{Ca}$  se registró con el protocolo de pulsos ilustrado en la parte superior. La amplitud del componente estacionario de  $I_{Ca}$  se midió al final de cada pulso (flecha).

Para medir  $I_{Ca-ss}$  se utilizó un protocolo de activación similar al utilizado en capítulos previos, con la diferencia de que la duración de los pulsos despolarizantes fue de 100 ms. Con esta duración fue posible desplegar en su totalidad el curso temporal de  $I_{Ca}$ . Como se observa en la figura 17,  $I_{Ca}$  muestra claramente la presencia de dos componentes, uno transitorio (activación seguida de inactivación), y otro estacionario. La

amplitud de este segundo componente se midió al final de cada pulso despolarizante.

El valor de la amplitud de  $I_{Ca-SS}$  se graficó en función del potencial de cada pulso despolarizante. El resultado se muestra en la figura 18, en donde también se incluye  $I_{Ca-win}$  escalada en su amplitud. La forma de las curvas y su localización en el eje del voltaje nos permite concluir que la identidad de ambas corrientes es la misma.



**Figura 18. Comparación entre la corriente de ventana y la estacionaria.** La corriente de ventana (línea continua) se escaló con respecto a la amplitud del componente estacionario de  $I_{Ca}$  (círculos negros, mediciones tomadas de la figura 17) y se graficó en función del potencial de membrana. Las ordenadas de la derecha muestran las unidades absolutas de la amplitud de  $I_{Ca}$  estacionaria.

# C A P I T U L O V

## I<sub>Ca</sub> DURANTE EL POTENCIAL DE ACCION

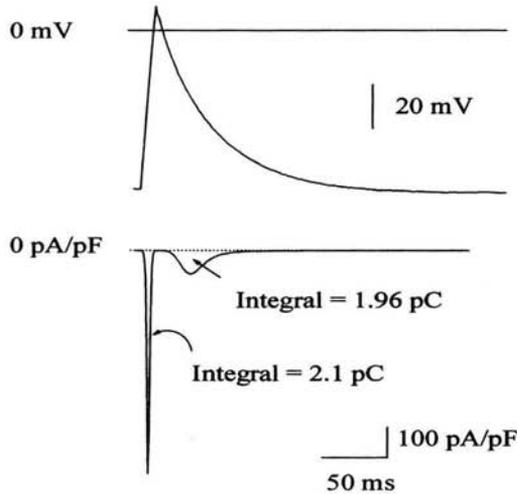
De los resultados anteriores se puede concluir que durante el curso temporal del PA cardiaco existe una activación secuencial de los diferentes componentes de I<sub>Ca</sub>. Durante la fase 0 de despolarización rápida, se activa el componente transitorio, cuya  $\tau$  de activación es de  $\sim 1.5$  ms, misma que se inactiva (componente rápido  $\tau_1 \sim 6$  ms) durante la fase de repolarización inicial o fase 1. Por la lentitud del segundo componente de inactivación ( $\tau_2 = 66$  ms), toda la fase 2 de meseta está dominada por I<sub>Ca</sub>, la cual correspondería a I<sub>Ca-ss</sub>.

Con el fin de cuantificar el flujo de Ca<sup>2+</sup> que acarrea cada componente de I<sub>Ca</sub> durante el PA realizamos el siguiente análisis. Con base en nuestros resultados cinéticos evaluamos la amplitud de I<sub>Ca</sub> en función a V<sub>m</sub> durante un PA típico de rata (figura 3). Para tal fin usamos la ecuación propuesta por Cohen y Lederer (1987):

$$I_{Ca}(V_m) = g_r(V_m - E_{Ca}) \left( \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-(V_m - V_{dh})}{K_d}\right)} \right) \left( \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{-(V_m - V_{fh})}{K_f}\right)} \right) \quad (11)$$

en donde V<sub>m</sub> es el potencial de membrana, g<sub>r</sub> es la conductancia relativa, E<sub>Ca</sub> el potencial de inversión de I<sub>Ca</sub>, y el resto de la ecuación representa el producto de d<sub>∞</sub> x f<sub>∞</sub> (I<sub>Ca-win</sub>). La conductancia relativa de I<sub>Ca</sub> se obtuvo ajustando la ecuación (11) (I<sub>Ca</sub>(V<sub>m</sub>)) a la relación I-V de I<sub>Ca-ss</sub> (figura 18). El mejor ajuste a los datos se obtuvo cuando g<sub>r</sub> tuvo un valor de 25.6 ± 2.4 nS (n = 17). Con esos parámetros calculamos la amplitud de I<sub>Ca</sub> para cada valor de potencial durante el PA. El resultado de este análisis se muestra en la figura 19.

En la parte superior se muestra el PA que se usó como variable independiente (V<sub>m</sub>) de la ecuación (11). La variable dependiente (I<sub>Ca</sub>(V<sub>m</sub>)) se graficó en función del tiempo lo que resultó en el trazo que se ilustra en el panel inferior de la figura 19. Claramente se pueden identificar los dos componentes de I<sub>Ca</sub>, el rápido coincide con la fase 0, mientras que el lento predomina en la fase 2 de meseta.



**Figura 19.  $I_{Ca}$  Durante el PA.** En el panel superior se muestra un PA de rata adulta con el que se calculó la magnitud de los componentes transitorio y estacionario de  $I_{Ca}$  (panel inferior).

Con el fin de calcular la magnitud del flujo de  $Ca^{2+}$  acarreado por cada componente de  $I_{Ca}$ , se calculó inicialmente la carga neta mediante integración de cada componente. El resultado indica que cada componente mueve prácticamente la misma carga ( $\sim 2$  pC/pF). Considerando la carga neta de cada ión  $Ca^{2+}$  ( $+2e = 3.204 \times 10^{-19}$  C) y a partir de la cantidad de carga movida por  $I_{Ca}$  durante el PA, se calculó que el influjo de  $Ca^{2+}$  es aproximadamente de  $1 \times 10^{-2}$  fmol/pF por cada componente, es decir que durante el PA, la cantidad de  $Ca^{2+}$  que ingresa a través de  $I_{Ca}$  es de  $\sim 2 \times 10^{-2}$  fmol/pF. Si consideramos, de acuerdo con nuestras mediciones, un área total de sarcolema de  $88 \mu\text{cm}^2$ , y que existe  $1 \mu\text{F}$  de capacidad por cada  $\text{cm}^2$  de membrana, obtenemos que la cantidad de  $Ca^{2+}$  que ingresa a la célula a través de  $I_{Ca}$ , durante un PA, es de  $2.2 \times 10^{-19}$  moles.

# D I S C U S I O N

## ***Potencial de Acción.***

El PA registrado en este trabajo muestra diferencias morfológicas significativas con respecto al registrado en otras especies, lo cual sugiere un comportamiento diferente de las corrientes iónicas que subyacen. La principal diferencia se observa en la duración del PA (figura 3). La duración del PA depende fundamentalmente de la duración de la fase de meseta, la cual a su vez está determinada por dos factores: 1) la disminución en la amplitud de  $I_{K1}$ , y 2) la activación de  $I_{Ca}$ . La disminución de  $I_{K1}$  y el aumento de  $I_{Ca}$  dan como consecuencia un incremento o disminución de la duración del PA.  $I_{Ca}$  es la responsable directa de la fase de meseta del PA y del aporte del  $Ca^{2+}$  necesario para efectuarse la contracción. De tal forma que la variación en la duración de la meseta indica una mayor o menor participación de  $I_{Ca}$ . Esto tiene como consecuencia un cambio en la morfología del PA y un cambio de la disponibilidad del  $Ca^{2+}$  necesario para efectuarse una contracción adecuada.

Nuestros resultados muestran la corta duración del PA que resulta de una fase de meseta breve, a diferencia del PA obtenido en miocitos ventriculares de cobayo. Estos resultados coinciden con los reportes realizados Cohen y Lederer (1988) y Kojima et al. (1990a).

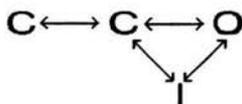
Las diferencias mencionadas no dependen exclusivamente de la especie, sino también de la etapa de desarrollo, como lo han reportado Kojima et al. (1990a) y Bernard (1975), quienes mostraron una mayor duración del PA en etapas más tempranas del desarrollo en la rata. También reportaron un aumento en la  $dV/dt$  a etapas más tardías del desarrollo, un aumento de la duración del PA y un aumento del potencial de reposo que coincidió con los resultados obtenidos y reportados en este trabajo. Estos autores atribuyen estos cambios principalmente a un incremento en la permeabilidad ( $P_K$ ) al  $K^+$ . Sin embargo, estos cambios pueden también deberse a incrementos en la expresión de los canales de  $Ca^{2+}$ , a una maduración de las estructuras celulares como el sistema de túbulos-T y del retículo sarcoplásmico y a una mezcla de la cinética tanto de  $I_{K1}$  como de  $I_{Ca}$ . Además, no se puede excluir la participación de otros mecanismos como el

intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

### **Curso Temporal de $I_{Ca}$**

El curso temporal de la  $I_{Ca}$  se caracterizó por presentar dos componentes: uno de activación y otro de inactivación (figuras 4, 5, 6, y 7). El curso temporal de la activación se caracterizó por ser rápido ( $\tau = 1.7$  ms; figura 5) encontrando el pico máximo de la corriente en 7 ms muy cercano al reportado por Isenberg y Klöcker (1980) en miocitos ventriculares de bovino y de rata, y al reportado por Wetzel y cols. (1991) de 8 ms en miocitos ventriculares de conejo.

Nuestros resultados indican que el curso temporal de la activación es monoexponencial, a diferencia de lo que se ha reportado previamente, en donde se indica que  $I_{Ca}$  se activa con un retardo que resulta en una activación sigmoidea, tal y como se ha visto en registros macroscópicos (Lee, K.S. y Tsien, R.W., 1991) y en corrientes ensambladas de registro unitarios. Estos reportes apoyan un modelo de activación con dos estados de cierre que preceden al de apertura ( $C \rightarrow C \rightarrow O$ ) con las transiciones entre estos estados altamente dependientes de voltaje y que ocurren en una escala de tiempo de pocos milisegundos. Estudios más recientes han sugerido otro modelo basado en la existencia de dos estados de cierre, uno de apertura, y uno de inactivación, lo cual implica un esquema markoviano como el siguiente:



Sin embargo, como se mencionó anteriormente en nuestras condiciones experimentales no es posible concluir respecto a la cinética de activación. La presencia de una corriente capacitiva de gran amplitud y lenta relajación no lo permite. De tal suerte, que, como se ilustra en la figura 5, nos limitamos a sugerir la existencia de una activación sigmoide, consistente con modelos más complejos.

La inactivación se presentó en forma incompleta. Este componente es uno de los aspectos más controvertidos de la cinética de  $I_{Ca}$ . Se han postulado tres hipótesis para

explicar el decaimiento observado: 1) depleción de la  $I_{Ca}$  en el lumen del túbulo-T (Almers et al., 1981); 2) acumulación del  $Ca^{2+}$  en el mioplasma lo cual podría reducir la fuerza electromotriz y/o inactivar la corriente mediante un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$ , (Brehm y Ecker, 1978; Tillotson, 1979); y 3) inactivación dependiente de voltaje (Cota et al., 1984; Cota y Stefani, 1989; Francini y Stefani, 1989; Mejía-Alvarez et al., 1991). La inactivación obtenida en esta tesis se ajustó con una biexponencial, con un componente rápido y otro lento ( $\tau = 12$  ms y  $\tau = 63.4$  ms, respectivamente) que de acuerdo a lo propuesto por Pelzer et al. (1990) el componente rápido es dependiente de  $Ca^{2+}$ , mientras que el lento es dependiente de voltaje.

La relación I-V que  $I_{Ca}$  despliega coincidió con los diferentes reportes publicados (Cohen y Lederer, 1988; Raymond et al., 1994; Wetzel et al. 1991; Klitzner et al., 1993). Tal relación mostró la característica forma de "U", con un umbral de activación en  $\sim -40$  mV, un valor de corriente máxima de  $802.7 \pm 131.6$  pA, a  $-10$  mV y un potencial de inversión aparente de  $\sim 35$  mV. Así mismo, se identificó una densidad de corriente de  $11 \pm 1.8$  pA/pF a  $-10$  mV muy cercana a densidad reportada por Raymond et al. (1994) para rata ( $8.12 \pm 0.75$  pA/pF). La dependencia de voltaje de  $I_{Ca}$  coincidió con la reportada incluso en otras especies, mostrando diferencias explicables por las diferentes concentraciones de  $Ca^{2+}$  utilizadas en los distintos trabajos.

### ***Cinética Estacionaria de $I_{Ca}$***

El componente de activación en el estado estacionario presenta una clara dependencia de voltaje con un  $k_d = 6.2$  mV y un  $V_h = -23.1$  mV, muy semejante a la reportada por Cohen y Lederer (1988) y por Raymond et al. (1994) en miocitos ventriculares de rata adulta ( $8.01$  mV y  $5.1$  mV, respectivamente). Existen otros reportes realizados para otras especies, como en conejo por Klitzner et al. (1993) y Osaka y Joyner (1993), que muestran una dependencia de voltaje similar a nuestras observaciones ( $k = 6.7$  mV y  $k = 5.4$  mV, respectivamente). En realidad las diferencias apreciadas no son significativas, sin embargo, pueden ser atribuidas a las distintas edades de los animales de experimentación y una vez más, a las concentraciones de  $Ca^{2+}$  utilizadas.

Nuestras mediciones de  $d_{\infty}$  indican un valor de saturación para la relación

conductancia potencial a potenciales positivos. Esto indica que la probabilidad de apertura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$ , alcanzó su máximo valor a potenciales despolarizantes, donde  $d_{\infty} = 1.0$ . Además, podemos concluir que aparentemente la activación durante el estado estacionario no sufre cambios importantes, aún tratándose de diferentes especies y que además conserva una clara dependencia de voltaje.

El componente de inactivación estacionaria al igual que el componente de activación, presentó una clara dependencia de voltaje. Esta inactivación es gobernada por dos mecanismos, uno dependiente de voltaje y otro dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Pelzer, et al., 1992). La curva que define la inactivación estacionaria es de tipo sigmoideo descrito por una ecuación de Boltzman, lo que sugiere la transición entre dos estados, en este caso entre uno activable hacia otro de inactivación. Presentó un  $V_h = -38.8$  mV y una  $k_f = 5.2$  mV, similar a la descrita por Cohen y Lederer (1988) y por Raymond et al. (1994) ( $k = 7.15$  mV y  $k_f = 7.2$  mV, respectivamente). En otras especies, tales como el conejo, Klitzner et al. (1993) y Osaka y Joyner (1991) reportaron resultados semejantes ( $k_f = 5.4$  mV y  $k_f = 4.9$  mV, respectivamente), lo que demuestra que a pesar de las posibles diferencias relacionadas a la especie, persiste una clara dependencia de voltaje de este parámetro. Esta curva  $f_{\infty}$  mostró una mayor fracción de canales activables a potenciales negativos y una disminución de esta fracción de canales a medida que el potencial de membrana se vuelve menos negativo (-30 mV a 0 mV).

La sobreposición de los parámetros estacionarios ( $d_{\infty}$  y  $f_{\infty}$ ) muestran un área claramente definida que se conoce como corriente de ventana ( $I_{\text{Ca-win}}$ ), la cual indica un flujo continuo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de una fracción de canales activados que son resistentes a la inactivación. Esta  $I_{\text{Ca-win}}$  presenta un valor máximo de corriente en -33.6 mV con la participación del 3.5% de los canales. Algunos autores como Cohen y Lederer (1988) han reportado valores menores para esta corriente y ubicados en potenciales de membrana alrededor de -12 mV, coincidiendo con el rango de voltaje en donde se despliega la fase de meseta. La interpretación de tales observaciones es que el resultado de una  $I_{\text{Ca-win}}$  de pequeña amplitud es una fase de meseta breve y de poca amplitud. Contrariamente, nuestros resultados indican que la participación del componente estacionario de  $I_{\text{Ca}}$  es considerablemente mayor, de lo que se deriva un ingreso significativo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la meseta del PA.

## C O N C L U S I O N E S

1. La morfología del PA se caracterizó por presentar una meseta breve, y una duración total que no excedió los 150 ms, lo cual es característico del músculo cardiaco de la rata adulta.
2. El curso temporal de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L ( $I_{\text{Ca}}$ ), exhibió una rápida activación seguida de un decaimiento incompleto más lento.
3. El curso temporal de la activación mostró un comportamiento exponencial simple, descrito por una  $\tau$  de 1.65 ms. Mientras que el de la inactivación mostró dos componentes, uno rápido definido por una  $\tau$  de 12 ms, y otro lento con una  $\tau$  de 63.4 ms.
4. La amplitud de la relación corriente-voltaje (I-V) exhibió un potencial umbral de activación de  $\sim -40$  mV, un valor de corriente máxima de  $802.7 \pm 131.6$  pA a  $-10$  mV y un potencial de inversión aparente de  $\sim -35$  mV. La densidad de  $I_{\text{Ca}}$ , mostró un valor máximo de  $11 \pm 1.8$  pA/pF.
5. La cinética estacionaria de  $I_{\text{Ca}}$  mostró una activación, definida por un  $V_h$  de  $-23.1$  mV y una  $k_d = 6.2$  mV, una inactivación caracterizada por un  $V_h = -38.8$  mV y una  $k_f$  de  $5.2$  mV.
6. La corriente de ventana ( $I_{\text{Ca-win}}$ ) indica la participación del 3.5% de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  los cuales son responsables del componente estacionario de  $I_{\text{Ca}}$ . Esta fracción contribuye de manera significativa al aporte de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el PA. Con base en nuestros resultados se calculó un ingreso total de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de  $I_{\text{Ca}}$  durante cada PA, de  $2.2 \times 10^{-19}$  moles.

# B I B L I O G R A F I A

- Almers, W.R. Fink y P.T. Palade (1981). Calcium depletion in frog muscle tubules. The decline of calcium current under maintained depolarization. *Journal of Physiology (London)*. **312**:177-207
- Alvarez, J.L. G. Vassort (1992). Properties of the low Threshold Ca current in single frog atrial cardiomyocytes. A comparison with the high threshold Ca current. *J. Gen. Physiology* 100:519-545
- Armstrong C.M. y F. Bezanilla (1977). Inactivation of the sodium channel. II Gating current experimentes. *J. General Physiology* 70: 567-590
- Arreola J., J. Calvo, M.C. García y J.A. Sánchez (1987). Modulation of calcium channels of twitch skeletal muscle fibres of the frog by adrenaline and cyclic adenosine monophosphate. *J. Physiol. London*. 393:307-330
- Balke, C.W., Rose, W.C., O'Rourke, B., Mejía-Alvarez, R., Backx, P.y Marban, E. (1993). Biophysics and Physiology of Cardiac  $Ca^{2+}$  Channels. *Circulation*. **87**:VII-49-53.
- Bean, B.P. (1985) Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *Journal of General*. **86**:1-30
- Bean, B.P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology; *Journal of General Physiology*. **86**:1-30.
- Bean, B.P. (1989) Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annual Reviews of Physiology*.-**51**: 367-384
- Bechem, M., S. Hebisch y M. Schramm (1988).  $Ca^{2+}$  agonist: new, sensitive probes for  $Ca^{2+}$  channels. *Trends Pharmacology Science* 9:257-261
- Bechem, M., Pott L., (1985). Remove of  $Ca^{2+}$  current inactivation in dialysed guinea pig atrial cardioballs by  $Ca^{2+}$  chelators. *Pflügers Archives* **404**:10-20.
- Bernard. C. (1975) Establishment of ionic permeabilities of the myocardial membrane during embryonic development of the rat. In *Developmental and Physiological Correlates of Cardiac Muscle* eds.Lieberman, M. y Sano, T. Raven Press pp 169-184 New York. U.S.A.
- Bernstein, J. (1912). *Elektrobiologie*. Viewag Braunschweig, 215 pp [1, 2, 7, 14)

- Bernstein, J. (1902). Untersuchungen zur thermodynamic der bioelektrischen strome. Erster theil. *Pflügers Arch.* 82:521-562.
- Bezanilla, F y C. M. Armstrong (1977). Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J. General Physiol* 70:549-566
- Brehm, P y R, Eckert (1978). Calcium entry leads to inactivation of a calcium channel in *Paramecium*. *Science*. **202**:1203-1206
- Campbell, D., Giles, W. Calcium currents. Calcium and Heart. Raven Press, Ltd. New York. (1990). Pp 27-83.
- Campbell, D.L., Giles, W.R., Hume, J.R., Shibata, E.F., (1988c). Inactivation of calcium currents in bullfrog atrial myocytes. *Journal of Physiology*. **403**:287-315.
- Cavalié, A, R. Ochi, D. Pelzer y W. Trautwein (1983). Elementary currents through Ca<sup>2+</sup> channels in guinea pig myocytes. *Pflügers Arch.* 398:294-296
- Cota, G. E. Stefani (1989). Effects of external calcium reduction on the kinetics of potassium contractures in frog twitch muscle fibres. *Journal of Physiology*. **317**:303-316.
- Cota, G., L. Nicola-Siri y E. Stefani (1984). Calcium channel inactivation in frog (*rana pipiens* y *rana moctezuma*) skeletal muscle fibres. *Journal of Physiology*. **354**:99-108.
- DiFrancesco, D., Noble, D., A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentrations changes. (1985) *Philosophical Transactions of the Royal Society of Sciences (London)*. **307**:353-398.
- Eckert, R y J.E. Chad (1984). Inactivation of calcium channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 44:215-267
- Fischmeister, R., Argibay, J.A. Hartzell, H.C. (1987) Modifications of cardiac calcium currents in cells with inherent differences in currents density. *Biophysical Journal*. **51**:29a.
- Fedida, D, D. Noble y A. J. Splinder (1988). Used-dependent reduction and facilitation of Ca<sup>2+</sup> current in guinea-pig myocytes. *J. Physiol. Lond.* 405:439-460
- Fox, A.P, Nowycky, M.C., Tsien, R. W. (1987a). Kinetics and Pharmacology properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurons. *Journal of Physiology (London)*. **394**:149-172.
- Fox, A.P, Nowycky, M.C., Tsien, R. W. (1987b). Single-channel recordings of three types

- of calcium in chick sensory neurones. *Journal of Physiology (London)*. **394**:173-200.
- Francini, F. y E. Stefani (1989). Decay of slow calcium current in twitch muscle fibres of frog is influenced by intracellular EGTA. *Journal of General Physiology* **94**:953-969.
- Glossman, H., Striessnig, J. (1990). Molecular properties of calcium channels. In: Blaustein MP et al. (Eds). *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* Vol. 114. Springer Berlin Heidelberg New York pp 1-106.
- Godfrain, T., Miller, R., Wibo, M. (1986). Calcium antagonist and calcium blockade. *Pharmacological Reviews*. **38**:321-416
- Hadley, R.W., Hume, J. R. (1987). An intrinsic potential-dependent inactivation mechanism associated with calcium channels in guinea pig myocytes. *Journal of Physiology (London)*. **389**:205-222.
- Hagiwara, N., H. Irisawa, and M. Kameyama (1988) Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potential of rabbit sino-atrial node cells. *Journal of Physiology (London)*. **395**:233-253.
- Hagiwara, S.: *Membrane potential-Dependent ion channels in cell membrane*. New York, Raven Press, 1983, pp 5-47.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann y F.J. Sigworth (1981). Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*. **391**:85-100
- Hess, P., Lansman, J.B., Tsien, R.W. (1986). Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. *Journal of General Physiology*. **88**:293-319.
- Hess, P. y R.W. Tsien (1984) Mechanisms of ion permeation through calcium channels. *Nature London*. **309**:453-456
- Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2a. ed. SINAUER. Estados Unidos 1992. pp 607.
- Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *Journal of Physiology (London)*. **117**:500-544.
- Huizinga, J.D., L. Fawarray, and A. Den Hertog. (1991). Generation of slow-wave-type action potentials in canine colon smooth muscle involves a non-L-type  $Ca^{2+}$  conductance. *Journal of Physiology (London)*. **442**:15-29.

- Hume, J.R. and Uehara, A. (1985). Ionic basis of the different action potential configurations of single guinea-pig atrial and ventricular myocytes. *Journal of Physiology (London)*. **368**:525-544.
- Iijima, T., Irisawa, H., Kameyama, M. (1985). Membrane currents and their modifications by acetylcholine in isolated single atrial cells of the guinea pig. *Journal of Physiology (London)*. **359**:485-501.
- Imoto, Y., Ehara, T., Goto, M. (1985). Calcium channel currents in isolated guinea pig ventricular cells superfused with  $\text{Ca}^{2+}$ -free EGTA solution. *Japanese Journal of Physiology*. **35**:917-932.
- Irisawa, H. (1984). Electrophysiology of single cardiac cells. *Japanese Journal of Physiology*. **34**:375-388.
- Isenberg, G y Klöckner, U. (1980). Glycocalix is not required for slow inward calcium current in isolated rat heart myocytes. *Nature Lond.* **284**:358-360
- Isenberg, G. y Klöckner, U. (1982). Calcium currents of isolated vobine ventricular myocytes are fast and of large amplitud. *Pflügers Archives*. **395**:30-41.
- Jahn, H., W., Nastainczyk, A., Röhrkasten, T. Schneider y F. Hofmann (1988). Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by camp- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II. *Eur. J. Biochem.* **178**:535-542.
- Janis, R.A., Silver, P.J., Triggle, D.J. (1987). Drug action and calcium cellular regulation. *Advances in Drug Research*. **16**:309-589.
- Josephson, I.R., Sanchez-Chapula, J., Brown, A. M. (1984). A comparasion of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells. *Circulation Research* **54**:144-156.
- Kass, R.S., Sanguinetti, M.C. (1984). Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium mediated mechanisms. *Journal of General Physiology*. **84**:705-726
- Katz, A.M. (1992) *Physiology of the Heart*, 2th. ed. Raven Press New York. U.S.A. cap. 1, 2.
- Kohlhardt, M., Krause, H., Kübler, M., Herdey, A (1975). Kinetic of inactivation and recovery of the slow inward in the mammalian ventricular myocordium. *Pflügers Archives* **355**:1-17
- Kojima, M., Sada, H., and Sperelakis, M. (1990a) Developmental changes in  $\beta$ -

- adrenergic and cholinergic interactions on calcium dependent slow actions potentials in rat ventricular muscles. *British Journal of Pharmacology*. **99**:327-333.
- Kokubun, S. y H. Reuter (1984). Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:4824-4827
- Lee, H.K., and K.M. Sanders. (1993). Comparisons of ionic currents from interstitial cells of canine colon. *Journal of Physiology (London)*. **460**:135-152.
- Lee, K.S., Marban, E, Tsien, R.W. (1985). Inactivation of calcium channel in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *Journal of Physiology (London)*. **364**:395-341
- Lee, K.S. y Tsien, R.W. (1984). High selectivity of calcium channels in single dialysed heart cells of the guinea-pig. *Journal of Physiology (London)*. **354**:253-272.
- Lew, W. Y.W., Hryhko, L.V. y Bers, D.M. (1991). Dihydropyridine receptors are primarily functional L-type  $Ca^{2+}$  channels in rabbit cardiac myocytes. *Biophysical Journal*. **59**:a201.
- Matsuda, H. Y Noma, A. (1984). Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cell of guinea-pig. *Journal of Physiology (London)*. **357**:553-573.
- Mejía-Alvarez, R., M. Fill, y E. Stefani (1991). Voltage-dependent inactivation of T-tubular skeletal calcium channels in lipid bilayers. *Journal of General Physiology*. **97**:393-412.
- McCleskey, E.W., Almers, W. (1985). The  $Ca^{2+}$  channel in skeletal muscle is a large pore. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **82**:7149-7153.
- McCleskey, E.W. y cosl. (1987).  $\omega$ -conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurones but no muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **84**:4327-4331.
- McDonald, T.F., Cavalié, A. Trautwein, W., Pelzer, D. (1986). Voltage-dependent properties of macroscopic and elementary calcium channels currents in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Archives*. **406**:437-438.
- Mentrand, D., Vasort, G., Fischmeister, R. (1984). Calcium-mediated inactivation of calcium conductance in cesium-loaded frog heart cells. *Journal of General Physiology*. **83**:105-131.
- Mitchell, M.R., Powell, T., Terrar, D.A. Twis, V.W. (1983). Characteristics of the second inward current in cells isolated from rat ventricular muscle. *Proceedings of the*

- Mitra R., and M. Morad. (1986) .Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 83:5340-5344.
- Nilius B., P. Hess, J. B. Lansman and R.W. Tsien (1985) A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature (London)*. 316:443-446
- Nilius, B. (1981) Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca<sup>2+</sup> channel. *Biomedical and Biochimica Acta*. 45:325-344.
- Nilius, B., Bennford, K. (1986). Joint voltage- and calcium-dependent inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels in frog atrial myocardium. *Biomedical and Biochimica Acta*. 45:795-811.
- Nowycky, M.C., A.P. Fox and R.W. Tsien. (1985) Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (London)*. 316:440-443.
- Patridge, L.D.: The physiology of calcium channels: An overview, in Hurwitz L., Patridge, L.D., Leach, J.K. (eds): Calcium Channels: Their properties, Functions, Regulation, and Clinical Significance. Boston. CRC Press, 1991, pp 63-67.
- Pelzer, D., Pelzer, S., and McDonald, T.F. (1990). Properties and Regulation of Calcium Channels in Muscle Cells. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 114:107-207.
- Pelzer, D., Pelzer, S., and McDonald, T.F. (1992). Calcium channels in heart. In: The Heart and Cardiovascular System (2<sup>nd</sup> ed.), edited by H.A. Fozzard, E. Haber, R. B. Jennings, A.M. Katz y H. E. Morgan. New York: Raven.1992. p. 1049-1089
- Pelzer, D., Cavalie, S., McDonald, E.F. Trautwein, W. (1986). Macroscopic and elementary currents through cardiac calcium channels. *Progress in Zoology*. 33:83-98.
- Perney, T.M., Hirning, L.D., Leeman, S.E., Miller, L.J. (1986) Multiple calcium channels mediate neurotransmitter release from peripheral neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 83:6656-6659
- Porzig, H. (1990) Pharmacological modulation of voltage-dependence Ca<sup>2+</sup> channels in intact cells. In: Blaustein MO et al. (Eds) Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, vol. 114. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 209-262.
- Rane, S.G., Holz IV, G.G., Dunlap, K. (1987). Dihydropyridine inhibition of neural calcium current and substance P release. *Pflügers Archives*. 409:361-366.
- Rasmusson R.L. y cols. (1990). A mathematical model of electrophysiological activity in

- a bullfrog atrial cell. *American Journal of Physiology*. **259**:H370-H389.
- Rasmusson, R.L., Clarck, J.W., Giles, W.R., Shibata, E.F., Campbell, B.L. (1990). A mathematical model of a bullfrog cardiac pacemaker cell. *American Journal of Physiology*. **259**:H352-H369.
- Reuter, H., C.F. Stevens, R.W. Tsien y G. Yellen (1982). Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature Lond.* **297**:501-504.
- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation of neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature (London)*. **301**:569-574.
- Reuter, H.(1967). The dependence of the slow inward current on external calcium concentration. *Journal of Physiology (London)*. **192**:479-492
- Sánchez, J.A. y E. Stefani (1978). Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog. *Journal of Physiology (London)*. **283**:197-209
- Sipido, K.R., Wier, W. (1991) Flux of  $Ca^{2+}$  across the sarcoplasmic reticulum of guinea pig cardiac cells during excitation-contraction coupling. *Journal of Physiology (London)*. **435**:605-630.
- Striessnig, J., B. J. Murphy y W.A. Catterall (1991). Dihydropyridine receptor of L-type  $Ca^{2+}$  channels: identification of Binding domains fo [ $^3H$ ](+)-PN200-100 y [ $^3H$ ]azidopine within the the  $\alpha 1$  subunit. *Proc. Nil. Acad. Sci. USA* **88**:10769-10773
- Takahashi, M. Y W. A. Catterall (1987). Dihydropyridine-sensitive calcium channels in cardiac and skeletal muscle membranes: studies with antibodies against the  $\alpha$  subunits. *Biochemistry* **26**:5518-5526
- Takahashi, M., M.J. Seagar, J.F. Jones, B.F.X. Reber y W. A. Catterall (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**:5478-5482
- Taylor, K.A., y L.A. Amos (1981). A new model for the geometry of the binding of myosin cross-bridges to muscle thin filaments. *Journal of Molecular Biology*. **147**:297-324.
- Terence F. McDonald, Siegfried Pelzer, Wolfgang Trautwein, and Dieter J. Peltzer (1994) Regulation and Modulation of Calcium Channels in Cardiac, Skeletal, and Smooth Muscle Cells. *Physiological Reviews*. **74**(2):365-507
- Tillotson ,D. (1979). Inactivation of  $Ca^{2+}$  conductance dependent on entry of  $Ca^{2+}$  ions in molluscan neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**(3):1497-1500.

- Tseng, G.N., Robinson, R.B., Hoffman, B.F. (1987). Passive properties and membrane currents of canine ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*. **90**:671-701.
- Tsien, R.W. (1983). Calcium channels in excitable cell membranes. *Annual Reviews in Physiology*. **45**:341-358.
- Tsien, R.W., Ellinor, P.T. y Horne, W.A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependence  $Ca^{2+}$  channels. *Trends. Pharmacol. Sci.* **12**:349-354
- Tsien, R.W., Hess, P., McCleskey, E.W. y Rosenberg, R.L.(1987). Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **16**:265-290.
- Tsien, R.W., Lipscombe, D. Madison, D.V., Bley, R.K., Fox, A.P. (1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS* **11**:431-438.
- Uehara, A., Hume, J.R. (1985). Interactions of organic calcium channel antagonists with calcium channels in single frog atrial cells. *Journal of General Physiology*. **85**:621-647.
- Wetzel, G.T., F. Chen y T.S. Klitzner (1993).  $Ca^{2+}$  channel kinetics in acutely isolated feta, neonatal and adult rabbit cardiac myocytes. *Circulation Research* **72**:1065-1074
- Zipes D. P. y Jalife, J. Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside. W.B. Saunders Company. Cap. 2, 19. (1990)

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**