



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PERMEABILIDAD A Na^+ POR EL CANAL DE Ca^{2+} DEPENDIENTE DE
VOLTAJE TIPO L EN MIOCITOS TRAQUEALES DE BOVINO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

KAREN ANDREA CASTRO GUZMÁN



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ**

VOCAL: **Profesor:** **JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

SECRETARIO: **Profesor:** **EDGAR FLORES SOTO**

1er. SUPLENTE: **MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**

2° SUPLENTE: **GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. EDGAR FLORES SOTO

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

SUSTENTANTE: KAREN ANDREA CASTRO GUZMÁN

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
<i>Regulación del Calcio (Ca^{2+})</i>	13
<i>Mecanismos que mantienen la $[Ca^{2+}]_i$</i>	14
<i>Intercambiador sodio/calcio (Na^+/Ca^{2+}) (NCX)</i>	15
<i>Mecanismos que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$</i>	18
<i>Canales de Ca^{2+} dependientes de Voltaje</i>	18
<i>Teorías de la contracción por cloruro de potasio (KCl) en medio sin Ca^{2+}.</i>	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO	25
MATERIAL Y METODOLOGÍA	26
<i>Mediciones de Na^+ intracelular en miocitos traqueales de bovino.</i>	28
<i>Permeabilidad a Na^+ a través de los VDCC-L</i>	28
<i>Acople electromecánico: incrementos en $[Na^+]_i$ inducidos por la depolarización de la membrana plasmática cuando es estimulada con 80 mM de KCl</i>	29

FÁRMACOS	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	29
RESULTADOS	30
<i>Curva concentración-respuesta de las $[Na^+]_i$</i>	30
<i>El NCX es el responsable de introducir el Na^+ al citoplasma de los miocitos traqueales de bovino.</i>	32
<i>Permeabilidad a Na^+ por el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L (VDCC-L) en miocitos traqueales de bovino</i>	35
<i>Acople electromecánico: incrementos en $[Na^+]_i$ inducidos por la depolarización de la membrana plasmática por la estimulación con 80 mM de KCl.</i>	40
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
BIBLIOGRAFÍA	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Bay-K8644	1,4-Dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-(2-[trifluorometil]fenil)piridina-3-carboxi metil éster
Ca ²⁺	Calcio iónico
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
[Ca ²⁺] _e	Concentración de Ca ²⁺ extracelular
°C	Grados centígrados
CPA	Ácido ciclopiazónico
CLM	Cadena ligera de la miosina
DAG	Diacilglicerol
D-600	Metoxiverapamil
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IP ₃	Inositol 1,4-5 trisfosfato
K ⁺	Potasio iónico
KCl	Cloruro de Potasio
KB-R7943	2-[2-[4-(4-nitrobenziloxi) fenil]etil]isotiourea mesilato
KRH	Solución Krebs Ringer Henseleit
Mm	Milimolar
μM	Micromolar
ML	Músculo Liso
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina

MLVA	Músculo liso de la vía aérea
MEM	Medio esencial mínimo para cultivo celular
Min	Minutos
Na ⁺	Sodio iónico
[Na ⁺] _i	Concentración de Na ⁺ intracelular
[Na ⁺] _e	Concentración de Na ⁺ extracelular
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NCX _{REV}	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ en su forma reversa
NEM	N-etilmaleimida
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PLC _β	Fosfolipasa C beta
PKC	Proteína cinasa C
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de membrana plasmática
RIP ₃	Receptor de trifosfato de inositol
ROC	Canales operados por Receptor
ROCK	Cinasa de Rho
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Receptor de Rianodina
SBFI-AM	Fluoróforo específico para Na ⁺
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del Retículo sarcoplásmico
SOC	Canales operados por el almacén
VDCC-L	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje tipo L
TMB-8	8-(dietilamino)octil -3,4,5-trimethoxybenzoato
TTX	Tetrodoxina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA

TÍTULO

-
- | | |
|---|--|
| 1 | Homeostasis y Dinámica del Ca^{2+} intracelular. |
| 2 | Bidireccionalidad del NCX. |
| 3 | Estructura molecular del NCX. |
| 4 | Estructura de las subunidades de los canales Ca_v1 . |
| 5 | Mecanismo de contracción por KCl. |
| 6 | Registros originales de órganos aislados. El KCl en medio sin Ca^{2+} produce una contracción transitoria, es bloqueada por la nifedipina y aumentada por el Bay-K8644. |
| 7 | Registros originales de la curva concentración respuesta de las $[\text{Na}^+]_i$ |
| 8 | Registro original donde la señal de Na^+ (50 mM) en la segunda respuesta comparada con la primera (control) no se ve modificada. |
| 9 | Registro original donde se muestra que los incrementos de las $[\text{Na}^+]_i$ por 50 mM, son bloqueadas por la Benzamil Amilorida 10 μM en medio sin Ca^{2+} . |

- 10 Registro original donde se corrobora que el NCX es el responsable de incrementar las $[Na^+]_i$ utilizando KB-R7943 10 μM en medio sin Ca^{2+}
- 11 Registro original donde se demuestra que la apertura del VDCC-L con Bay K8644 (1 μM) en medio sin Ca^{2+} incrementa las $[Na^+]_i$
- 12 Registro original donde se observa que el D600 (30 μM) en medio sin Ca^{2+} inhibe el efecto del Bay-K8644.
- 13 Registro original donde se evidencia el incremento del Na^+ (50 mM) en presencia de Bay K8644 (1 μM) en medio con Ca^{2+} .
- 14 Registro original donde se muestra el aumento del Na^+ (50 mM) en presencia de KCl (80 mM) en medio sin Ca^{2+} .

RESUMEN

El músculo liso de las vías aéreas (MLVA) estimulado con KCl se despolariza, induciendo la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (VDCC-L). Hasta la fecha se pensaba que el VDCC-L solo era permeable al ión Ca^{2+} , sin embargo estudios previos demuestran que la estimulación del MLVA con KCl en medio sin Ca^{2+} produce una contracción transitoria, a través de la activación del receptor a IP_3 (RIP_3), activación de los receptores a rianodina (RyR) y como consecuencia la activación de la vía de señalización de RhoA/cinasa de Rho (ROCK). En un trabajo previo, observamos que esta contracción transitoria era bloqueada por la nifedipina, aumentada por el Bay-K8644 y bloqueada por TMB-8, pero no por N-etilmaleimida (NEM) y U-73122. Por lo tanto, en este trabajo investigamos si el VDCC-L permite la entrada de otro ión diferente al Ca^{2+} como el Na^+ . A través de la técnica de microfluorometría cuantificamos $[\text{Na}^+]_i$ en miocitos traqueales de bovino, utilizando SBFI-AM como fluoróforo específico para el ión Na^+ . Realizamos una curva a diferentes concentraciones de $[\text{Na}^+]_e$ (5-135) mM y observamos que el incremento en la fluorescencia para SBFI-AM se puede traducir en un incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ y este aumento es dependiente de la concentración (todos los experimentos se realizaron en medio sin Ca^{2+}). Para los siguientes experimentos utilizamos la concentración 50 mM, observamos que estimular 2 veces a la misma célula con esta concentración no se presenta algún cambio en la segunda respuesta comparada con la primera (control), dado que existe una proteína membranal cuya función principal es introducir Na^+ al citoplasma celular (el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)). Corroboramos a través de herramientas farmacológicas que la administración de Benzamil Amilorida y el KB-R7943 (ambos bloqueadores del NCX) disminuía significativamente los incrementos observados por la $[\text{Na}^+]_e$ de 50 mM. La presencia del Bay-K8644 en la segunda respuesta a Na^+ 50 mM incrementa las $[\text{Na}^+]_i$, lo mismo sucede cuando se estimula al VDCC-L con una concentración alta de KCl (80 mM). El incremento inducido por Bay-K8644 fue bloqueado por D-600 cuando se administran simultáneamente, observándose únicamente el incremento inducido por el NCX. Finalmente, realizamos el mismo experimento con Bay-K8644 en un medio con Ca^{2+} , observando un aumento

significativo de la segunda respuesta. Por lo tanto, podemos concluir que: **1)** El incremento en la fluorescencia para el SBFI-AM se puede traducir en un incremento en la $[Na^+]_i$. **2)** El NCX es el principal mecanismo por el cual entra Na^+ al citoplasma celular. **3)** El VDCC-L, es permeable al ión Na^+ en miocitos traqueales de bovino en condiciones con y sin Ca^{2+} .

ABSTRACT

The smooth muscle airways (MLVA) stimulated in vitro with KCl depolarizes, inducing the opening of Ca^{2+} channels voltage-dependent L-type (VDCC-L). Until now it was thought that the VDCC-L was only permeable to Ca^{2+} ion, however preliminary studies show that stimulation MLVA with KCl in medium without Ca^{2+} causes a transient contraction, through receptor activation IP_3 (RIP_3) and activation of the ryanodine receptor (RyR) and consequently the activation of RhoA signaling pathway Rho/kinase (ROCK). In a previous study, we observed that this transient contraction was blocked by nifedipine, increased by the Bay-K8644 and blocked by TMB-8, but not by N-ethylmaleimide (NEM) and U-73122. Therefore, this study investigated whether VDCC-L allows the entry of a different ion Ca^{2+} as Na^+ . Through microfluorometry technique we measure the $[\text{Na}^+]_i$ in bovine tracheal myocytes using SBFI-AM as a specific fluorophore for the Na^+ ion. We conducted a curve at different concentrations of extracellular Na^+ ($[\text{Na}^+]_e$) (5-135) mM, and we observed that the increase in fluorescence for SBF-AM can be translated into an increase in $[\text{Na}^+]_i$ and this increase is dependent on the concentration (all experiments were performed in medium without Ca^{2+}). For these experiments we used the 50 mM concentration, we note that stimulate 2 times to the same cell with this concentration was not any change occurs in the second response compared with the first (control), since there is a membrane protein whose main function is to introduce Na^+ to the cellular cytoplasm (the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger (NCX)). Corroborated by pharmacological tools that administration of Benzamil Amiloride and KB-R7943 (both blockers NCX) significantly decreased by the increases observed $[\text{Na}^+]_i$ of 50 mM. The presence of Bay-K8644 in the second response to 50 mM Na^+ increases the $[\text{Na}^+]_i$, the same happens when stimulated to VDCC -L with a high concentration of KCl (80 mM). The increase induced by Bay-K8644 was blocked by D-600 when administered simultaneously, observing only induced increase the NCX. Finally, we performed the same experiment with Bay-K8644 in a medium with Ca^{2+} , noting a significant increase in the second answer. Therefore, we can conclude that: 1) The increase in fluorescence for SBFI can translate into an increase in $[\text{Na}^+]_i$. 2) The NCX is the

main mechanism by which Na^+ enters the cell cytoplasm. 3) The VDCC-L, is permeable to Na^+ ion in bovine tracheal myocytes conditions with and without Ca^{2+} .

INTRODUCCIÓN

Regulación del Ca^{2+} .

El ión calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular de gran importancia, se encuentra presente en todos los tipos celulares y tiene una participación muy versátil. El incremento de la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en el tiempo y el espacio regula múltiples procesos celulares. En microsegundos se genera excitotoxicidad; en milisegundos, contracción y por minutos u horas origina eventos tales como la transcripción, fertilización, proliferación celular y apoptosis (**Fig.1**) (Berridge *et al.*, 2003).

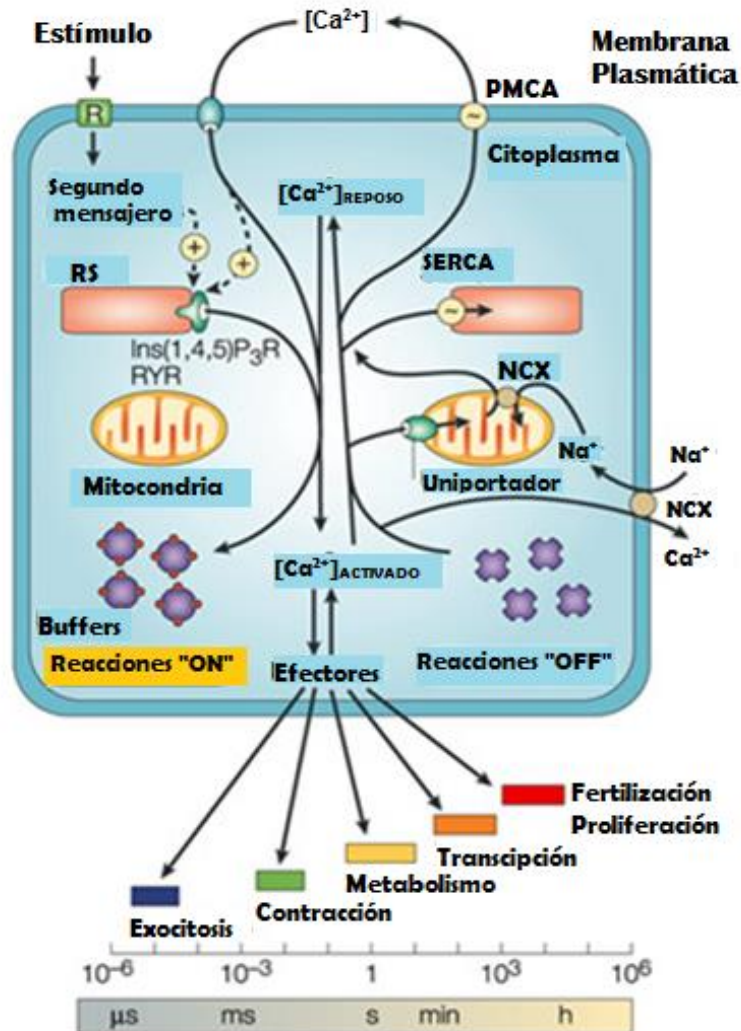


Fig 1. Homeostasis y Dinámica del Calcio intracelular. (Tomada de Berridge *et al.*, 2003).

En células del músculo liso existe un organelo muy desarrollado que sirve como almacén de Ca^{2+} , manteniendo concentraciones de alrededor de 5-10 mM, denominado retículo sarcoplásmico (RS) el cuál participa de forma importante en la señalización del Ca^{2+} intracelular así como en la contracción del músculo liso (Edes & Kranias 1998; Horowitz *et al.*, 1996). En estas células la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo es aproximadamente de 100 nM y es necesaria para mantener el tono basal del músculo liso (Montaño & Bazán, 2005). Por otro lado, la $[\text{Ca}^{2+}]_e$ fisiológica de éste ion es de aproximadamente 1 a 2 mM (Horowitz *et al.*, 1996). Cuando las células son estimuladas por agonistas broncoconstrictores como acetilcolina, histamina, serotonina y otros, pueden incrementar las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aproximadamente entre 500-700 nM (Montaño *et al.*, 2003; Carbajal *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2008; Perusquía *et al.*, 2014). Es conocido que el aumento o la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tiene un papel muy importante en la contracción/relajación del músculo liso de la vía aérea (MLVA).

Mecanismos que mantienen la $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Existen diferentes mecanismos con importantes funciones homeostáticas que se encargan de mantener las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo las cuales oscilan (~ 100 nM), así como también se aseguran que los depósitos internos del RS se mantengan llenos de Ca^{2+} (Berridge *et al.*, 2003). A la fecha se conocen al menos 3 proteínas transportadoras: **1)** ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA, por sus siglas en inglés) la cual es la encargada de transportar el Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular. **2)** La ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA, por sus siglas en inglés) encargada de transportar el Ca^{2+} del citoplasma al interior del RS, ambos transportadores utilizan como fuente de energía al ATP para el transporte de Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico, ambas bombas poseen 10 dominios transmembranales, sin embargo, la homología entre ellas es muy baja (Clapham, 1995). La PMCA y la SERCA presentan una gran afinidad por el Ca^{2+} pero una velocidad de transporte baja en comparación con canales y cotransportadores que trabajan sin gasto de energía (Bordallo *et al.*, 2001).

3) El NCX, es un cotransportador que introduce 3 iones Na^+ al citoplasma por 1 ión Ca^{2+} que saca del citoplasma al espacio extracelular trabajando a favor del

gradiente electroquímico del Na^+ (Billington & Peen, 2003). Existen además, en el citoplasma celular, diversas proteínas consideradas amortiguadoras de Ca^{2+} , como las proteínas de la familia de las calmodulinas, anexinas y la calpaína (Berridge *et al.*, 2003; Floyd, 2007). Por cuestiones de esta tesis se describirá a fondo el papel de este cotransportador, el cual se ve involucrado en la dinámica y regulación del ión Na^+ en las células musculares lisas de bovino.

Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

En los años 60's Reuter & Seitz, postulan un mecanismo responsable de expulsar Ca^{2+} del citoplasma al medio extracelular, señalando que este eflujo de Ca^{2+} es reducido si se elimina el Na^+ extracelular. En 1969 Baker *et al.*, propusieron en axones de calamar, que el Ca^{2+} podría ser bombeado fuera de las células por un mecanismo donde se intercambiaba el Na^+ externo por Ca^{2+} del citoplasma.

Posteriormente en un modelo de músculo cardiaco de cobayo se encontró, que el eflujo de Ca^{2+} se veía incrementado con altos niveles en $[\text{Na}^+]_i$ y que las aurículas de cobayo con una $[\text{Na}^+]_i$ incrementada mostraban una respuesta contráctil ionotrópica positiva (Glitsch *et al.*, 1970). A partir de entonces, se ha reportado al NCX en diversas células y tejidos animales, constituyendo uno de los mecanismos más importantes para expulsar el Ca^{2+} citoplasmático hacia el espacio extracelular (DiPolo & Beauge, 2006).

El NCX en su **forma normal** introduce 3 iones Na^+ al citoplasma por cada ión de Ca^{2+} que expulsa hacia el líquido extracelular. Este intercambiador tiene la capacidad de cambiar su bidireccionalidad dependiendo del gradiente de Na^+ , en su **forma reversa** (NCX_{REV}) va a introducir un ión Ca^{2+} al interior de la célula por 3 iones Na^+ que expulsa al espacio extracelular de la célula (**Fig.2**)

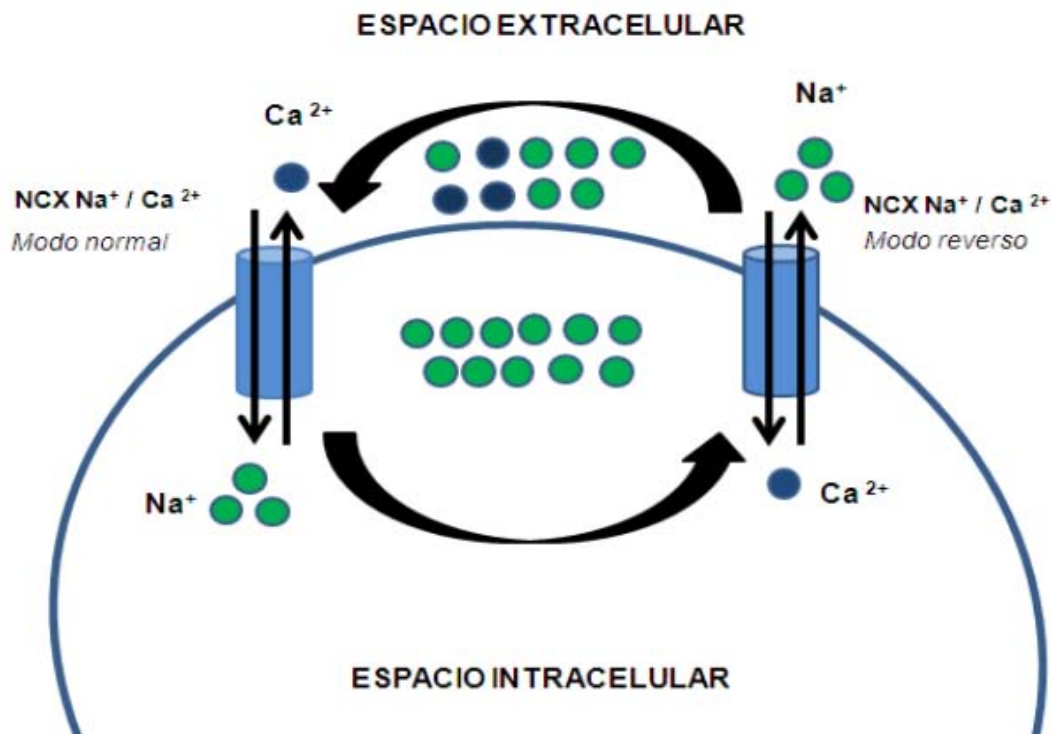


Fig 2. Bidireccionalidad del intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (Tomada de Cobar *et al.*, 2010).

La familia del NCX en mamíferos es producto de 3 diferentes genes: NCX 1, 2 y 3. El primero de ellos es la principal isoforma reportada y se expresa principalmente en músculo cardíaco (Matsuda *et al.*, 1997, Blaustein & Lederer, 1999), aunque puede encontrarse en casi todos los tejidos; el **NCX2** comparte un 65 % de similitud con **NCX1** y su localización parece estar restringida al músculo esquelético, cerebro y estómago y el **NCX3** se localiza en cerebro, músculo esquelético, músculo liso vascular y MLVA (Matsuda *et al.*, 1997; Mejía-Elizondo *et al.*, 2002; Cobar *et al.*, 2010; Flores-Soto *et al.*, 2011).

Estructuralmente el NCX descrito en músculo cardíaco (**Fig 3**), consta de 939 aminoácidos, los cuáles conforman 9 segmentos transmembranales separados en dos dominios. El dominio amino terminal está constituido por 5 de los 9 segmentos transmembranales (1-5) y presenta una región conformada por 32 residuos la cual tiene un sitio de glicosilación en el residuo número 9, una larga asa intracelular de aproximadamente 550 aminoácidos que une al dominio amino terminal con el

dominio carboxilo terminal, el cual está constituida de los segmentos 6 al 9. El asa intracelular posee sitios regulatorios que no parecen estar involucrados en el transporte iónico (Mastuda *et al.*, 1997; Cobar *et al.*, 2010).

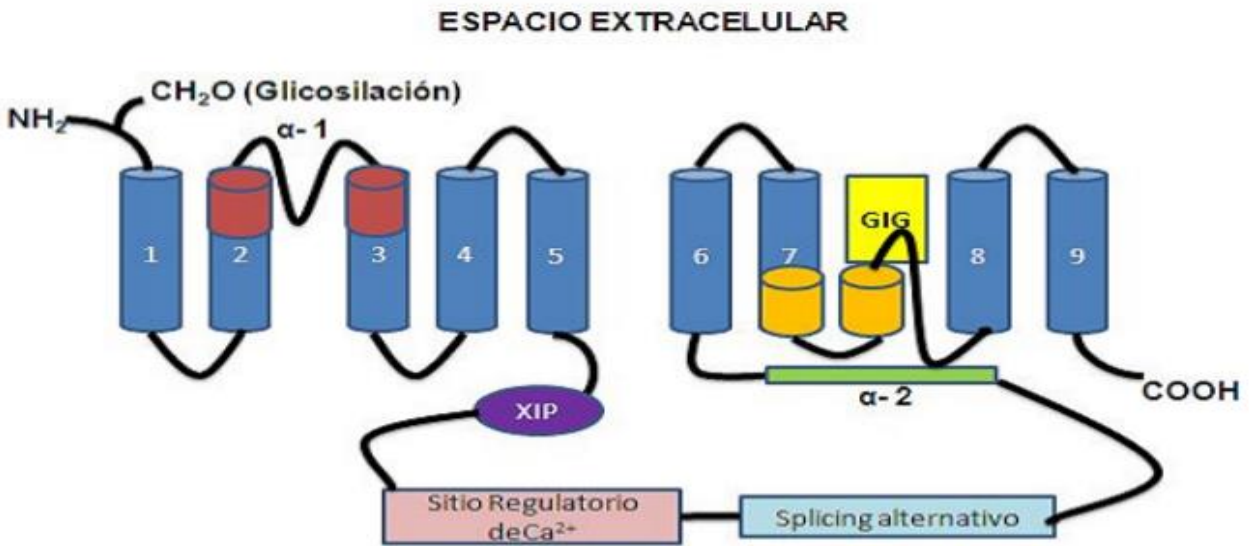


Fig 3. Estructura molecular del NCX (Tomada de Cobar *et al.*, 2010)

A partir del año 2000 varios autores reportan directamente la participación del NCXREV como uno de los principales mecanismos responsables en la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$ y la contracción del ML. Se encontró en el MLVA de bovino que la estimulación con diferentes agonistas contráctiles como acetilcolina, histamina y serotonina movilizaban al ión Ca^{2+} del RS, proponiendo que el vaciamiento del RS activaba a los canales operados por el almacén o entrada capacitativa (SOC) así como a los canales operados por receptor (ROC). Ambos mecanismos permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^{2+} al citoplasma, este incremento de $[Na^+]_i$ despolariza la membrana favoreciendo la apertura de los VDCC-L e induce la NCXREV en MLVA, permitiendo la entrada de Ca^{2+} al citoplasma para favorecer el relleno del RS (Hirota & Jansen, 2007; Flores-Soto *et al.*, 2011).

Mecanismos que aumentan las $[Ca^{2+}]_i$.

Para que las $[Ca^{2+}]_i$ se vean incrementadas existen dos fuentes principales:

1) La intracelular, las cuales involucra a dos receptores canal localizados en la membrana del RS por medio de los cuales el ión Ca^{2+} puede salir al citoplasma. El primero de ellos es el receptor de trifosfato de inositol (RIP₃) y el otro es el receptor a rianodina (RYR) (Bazán-Perkins *et al.*, 2000 y 2003).

El IP₃ actúa como un segundo mensajero que al activar a su receptor en el RS permitirá la salida de Ca^{2+} al citoplasma de la células iniciando los diferentes procesos para producir contracción en el MLVA (Rueda *et al.*, 2002; Carbajal *et al.*, 2005). La formación del IP₃ está ligada a la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana (PI) (Berridge, 2009) por medio de la vía de la fosfolipasa C (PLC), en MLVA. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) tienen como principal efector a la PLC β , la cual hidroliza al PIP₂ para producir IP₃ y DAG (Billington & Penn, 2003; Berridge, 2003). La generación de estos dos segundos mensajeros llevará a un incremento en las $[Ca^{2+}]_i$ y la posterior activación de la proteína cinasa C (PKC) lo que contribuirá a la contracción del MLVA (Billington & Penn, 2003; Berridge *et al.*, 2003; Somlyo & Somlyo, 2003).

El RyR representa otra de las salidas de Ca^{2+} del RS. Este receptor puede ser activado con $[Ca^{2+}]_i$ por arriba de 100 nM, así como por su activador endógeno el ADP ribosa y por moléculas como rianodina y cafeína (Pessahh *et al.*, 1987).

2) La extracelular: El Ca^{2+} que proviene del espacio extracelular ingresa al citoplasma a través de VDCC-L, por ROC (Montaño *et al.*, 2005; Kotlikoff, 1998); por SOC (Flores-Soto *et al.*, 2013; Perusquía *et al.*, 2014; Smyth *et al.*, 2010) estos dos últimos canales son capaces de permitir la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma (canales catiónicos inespecíficos) y el NCXREV (Cóbar *et al.*, 2010).

Canales de calcio dependientes de Voltaje.

Los canales de Ca^{2+} se localizan en la membrana plasmática de células excitables como neuronas y células musculares. Estos canales permiten la entrada de Ca^{2+} al

citoplasma en respuesta a una despolarización de la membrana. (Bean *et al.*, 2001; Catterall *et al.*, 2005; Catterall WA., 2000).

Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 1993), denominados T, L, N, P, Q y R, estos canales se pueden clasificar atendiendo a sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas (Catterall *et al.*, 2000). Sin embargo, la clasificación más utilizada se basa en el rango de voltaje necesario para su activación, clasificándolos en dos categorías: canales de Ca^{2+} de bajo y de alto umbral. El canal de tipo T es el único canal de Ca^{2+} de bajo umbral debido a que presenta corrientes pequeñas de carácter transitorio, mientras que los canales de tipo L, N, P, Q y R han sido caracterizados como canales de Ca^{2+} de alto umbral debido a que se requieren grandes despolarizaciones para su activación.

Los VDCC-L se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en la mayoría de las células no excitables. Este tipo de canales tipo L (“Long lasting”), que pertenecen al grupo de los canales que se activan por alto voltaje, son los responsables de corrientes de Ca^{2+} registradas en células endócrinas donde median la secreción, y en células musculares (Catterall *et al.*, 2005) incluyendo el MLVA donde intervienen en el proceso de contracción (Carrabjal *et al.*, 2005) y de relleno de Ca^{2+} del RS (Borreau *et al.*, 1991; Janssen & Hirota, 2007; Flores-Soto *et al.*, 2013). Los canales de Ca^{2+} son proteínas pentaméricas (**Fig 4**), de las cuales la subunidad $\alpha 1$ es la más importante y determina el subtipo. Esta subunidad cuenta con dominios homólogos y regiones amino y carboxilo terminales intracitoplasmáticas (Catterall WA., 1993). Cada dominio homólogo contiene seis hélices transmembranales (S1 a S6) y un rizo en forma de “p” entre S5 y S6 que forma la región selectiva del catión. Por su parte, las hélices S4 tienen aminoácidos con carga positiva en cada tercera posición, lo que permite sensar la depolarización membranal y abrir el poro (Catterall *et al.*, 2005). Los canales de Ca^{2+} han sido nombrados usando el símbolo químico del principal ión que permean (Ca^{2+}) con el principal regulador fisiológico (voltaje) indicado como subíndice (Cav). El identificador numérico corresponde a la subfamilia del gen de la subunidad $\alpha 1$ dentro de la subfamilia (1 hasta n). De acuerdo con esta nomenclatura, la subfamilia

Cav1 (Cav 1.1-Cav 1.4) incluye canales que median corrientes de Ca^{2+} tipo L, presentándose en MLVA la forma Cav 1.2 (Catterall *et al.*, 2005).

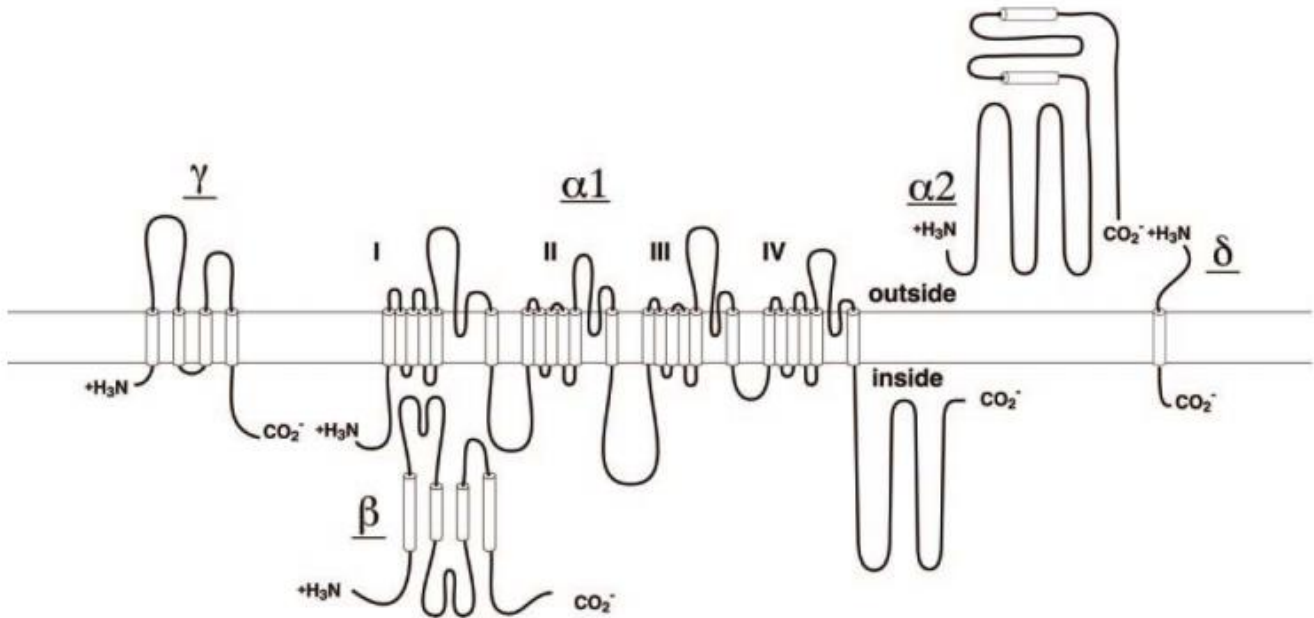


Fig 4. Estructura de las subunidades de los canales Cav 1. Se ilustra la composición y estructura del canal de calcio purificado de músculo esquelético. Este modelo se ajusta bioquímica y molecularmente a los otros canales Cav 1 y a los canales Cav 2. Las α hélices se muestran en cilindros (Tomada de Catterall *et al.*, 2005).

Los canales tipo L están caracterizados farmacológicamente debido a la sensibilidad que presenta al bloqueo por dihidropiridinas, como la nifedipina (Bruce, 2001). Las dihidropiridinas pueden ser activadoras o bloqueadoras del canal, por lo que se cree actúan alostéricamente para mantener en una conformación abierta o cerrada. Su sitio de unión incluye a residuos de aminoácidos (TTLLQ) S del dominio III y del segmento S5 (Scragg *et al.*, 2007) distintos tipos de fármacos no dihidropiridinicos incluyendo verapamil (una fenilalquilamina) y diltiazem (una benzodiazepina) también bloquean VDCC-L. Se han encontrado VDCC-L en músculo cardíaco, músculo liso y esquelético, fibroblastos y otros tipos celulares.

El MLVA estimulado *in vitro* con KCl se depolariza, induciendo la apertura de los VDCC-L. Durante el potencial de reposo (~ -60 mV) los canales permanecen cerrados y dependiendo del subtipo de canal la apertura puede ocurrir al alcanzar

voltajes de ~ -45 mV. (Montaño *et al.*, 1996). Al ocurrir una despolarización de la membrana del MLVA se promueve la entrada de Ca^{2+} a través de los canales VDCC-L y la consecuente contracción del músculo liso. El aumento en la concentración de KCl en el medio extracelular cambia el potencial de membrana aproximadamente -60 mV a -20 mV (Liu *et al.*, 2005), depolarización suficiente para abrir los VDCC-L (Fig. 5).

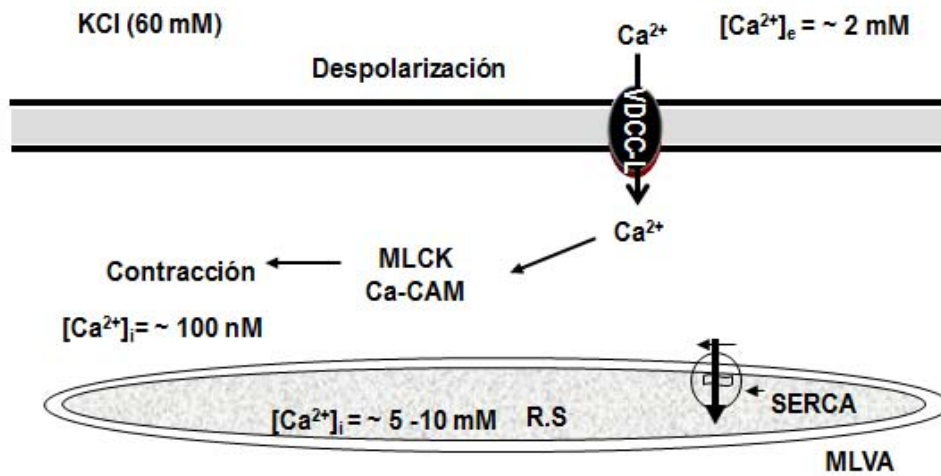


Fig. 5. Mecanismo de contracción por KCl. Representación gráfica del modelo general del mecanismo celular de una depolarización de la membrana inducida por concentraciones altas de K. La depolarización de la membrana provoca la apertura de los VDCC-L elevando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El Ca^{2+} libre en el citosol se une a la calmodulina (CaM) formando el complejo Ca^{2+} -CaM capaz de activar a la quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) para que fosforile a la cadena ligera de la miosina 20 kDa (MLC20) e inducir la contracción (imagen no publicada).

Teorías de la contracción por KCl en medio sin Ca^{2+} .

Por mucho tiempo se consideró que la contracción del MLVA inducido por KCl era a través de Ca^{2+} extracelular que ingresaba por el VDCC-L. Sin embargo, actualmente se sabe que la depolarización inducida por KCl en un medio sin Ca^{2+} puede provocar la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) mediante diferentes mecanismos. (Jansen *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2009).

En 2004 Jansen *et al.*, reportaron por primera vez que el KCl producía una contracción transitoria en un medio sin Ca^{2+} y observó que bajo estas condiciones se activaba la vía de Rho-A/ROCK (responsables de la contracción tónica). Para el 2009 Liu *et al.*, encontraron en miocitos de ratón que la depolarización química y eléctrica de la membrana activaba al receptor M_3 sin el acople de su agonista natural, activando a la proteína Gq e induciendo la vía de la fosfolipasa $\text{C}\beta$ ($\text{PLC}\beta$ /fosfatidil inositol trifosfato, IP_3), con la subsecuente activación del RIP_3 y la liberación de Ca^{2+} del RS. Por otro lado, también demostraron que los RyR_2 se activaban y se abrían para liberar Ca^{2+} del RS, bajo las mismas condiciones de un medio sin Ca^{2+} .

Estudios funcionales realizados en el laboratorio de asma, muestran que el KCl produce una contracción transitoria cuando el tejido esta incubado en un medio sin Ca^{2+} , similares a los datos encontrados por Janssen & Liu. En este sentido, se encontró que esta contracción es bloqueada por el TMB-8 (bloqueador del RIP_3) así como por nifedipina (bloqueador de los VDCC-L) y se ve aumentada cuando se usa Bay-K8644 (activador del VDCC-L) (**Fig 6**).

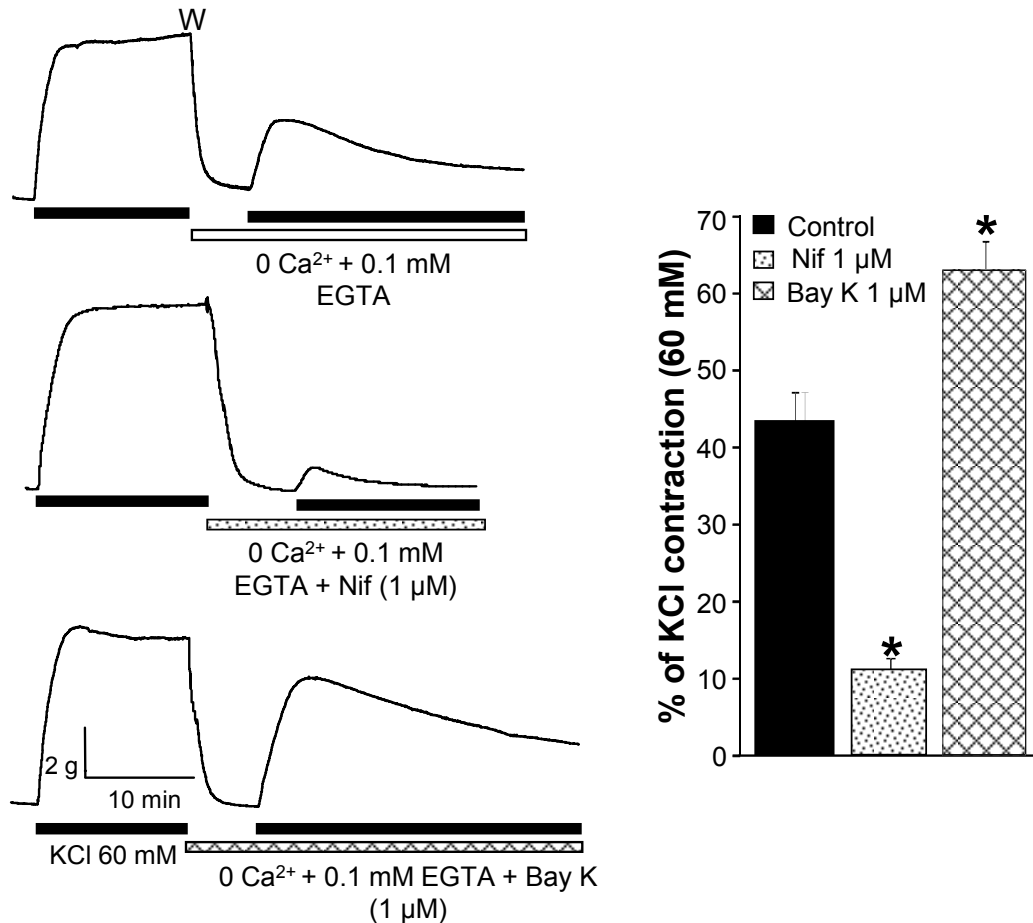


Fig. 6. Registro original. Efecto del bloqueo y activación farmacológica del VDCC-L. La nifedipina disminuye la contracción del MLVA en un medio sin Ca²⁺ inducida por KCl; El Bay-K8644 aumenta la contracción del MLVA en KH sin Ca²⁺ inducida por KCl dando indicios a que los VDCCL participan en este fenómeno (Datos no publicados).

El hecho de que la contracción transitoria inducida por KCl en un medio sin Ca²⁺ fuera bloqueada por la nifedipina y aumentada por el Bay-K8644, nos permite pensar en la participación del VDCC-L sobre dicho fenómeno, y bajo las condiciones experimentales utilizadas se permite proponer que por éste canal también entra Na⁺.

De acuerdo a nuestro planteamiento, en la literatura existen evidencias científicas sobre la inespecificidad del canal en otros tipos celulares, bajo condiciones de un medio sin Ca^{2+} .

La permeabilidad de iones monovalentes como el Na^+ a través de los canales de Ca^{2+} no es un tema nuevo. Las primeras evidencias de dicho fenómeno fueron en 1968 por Keatinge quien encontró en músculo liso vascular de oveja que el tejido se vuelve eléctricamente activo en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Posteriormente Prosser *et al.*, 1977, observaron en músculo liso circular intestinal de gato que la despolarización dependiente de Na^+ fue abolida por verapamil y metoxiverapamil (D-600). En 1986, Hess *et al.*, reportan que la permeabilidad selectiva de los VDCC-L en células ventriculares de cobayo depende de la presencia de iones divalentes (Ca^{2+}) en el medio. Ellos encontraron que las corrientes de Na^+ a través de los VDCC-L estaban presentes en ausencia de Ca^{2+} y eran bloqueadas con su administración.

Estos hallazgos también fueron reportados en células no excitables como las de epitelio de conejo (Bernd *et al.*, 2000) y espermatozoides humanos (Torres *et al.*, 2011), donde la eliminación de Ca^{2+} externo favorecía la permeabilidad de Na^+ a través de canales de Ca^{2+} . Por lo tanto en este trabajo se explorará la posibilidad de que el Na^+ pudiera permear a través del VDCC-L en el músculo liso traqueal de bovino.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el MLVA de bovino es conocido que los VDCC-L permiten la entrada del ion Ca^{2+} . Estudios preliminares en órganos aislados nos permitieron proponer que bajo las condiciones experimentales de KH sin Ca^{2+} el Na^+ ingresa al citoplasma a través de los VDCC-L.

HIPOTESIS

Es conocido que en músculo liso vascular, músculo liso intestinal y células ventriculares de diferentes especies, el VDCC-L en un medio extracelular sin Ca^{2+} vuelve inespecífico permitiendo la entrada de Na^+ , entonces la selectividad del VDCC-L en el MLVA de bovino bajo estas condiciones experimentales de un medio extracelular con y sin Ca^{2+} se pierde permitiendo la entrada de Na^+ .

OBJETIVO GENERAL:

Corroborar la selectividad de los VDCC-L en miocitos traqueales de bovino, cuando son perfundidos extracelularmente con KRH 50 mM de Na^+ con y sin Ca^{2+}

Objetivos específicos:

- Determinar las $[\text{Na}^+]_i$ en célula única perfundidas en un KRH a diferentes $[\text{Na}^+]_e$.
- Caracterizar el mecanismo por el cuál este ingresando el Na^+ al interior de la célula, utilizando Benzamil amilorida (Bloqueador del NCX) (10 μM) y KB-R7943 (Bloqueador del ambas fases del NCX) (10 μM) en un medio sin Ca^{2+} .
- Determinar si la estimulación con Bay K8644 (activado alosterico de VDCC-L) (10 μM) en un medio con y sin Ca^{2+} incrementa las $[\text{Na}^+]_i$.

- Demostrar que el incremento de las $[Na^+]_i$ causado por la administración Bay-K8644 es a través del VDCC-L, utilizando D-600 (metoxiverapamil) (bloqueador de los VDCC-L) (30 μ M).
- Corroborar la permeabilidad a Na^+ por el VDCC-L utilizando KCl 80 mM bajo las mismas condiciones utilizadas con Bay K8344 en un medio sin Ca^{2+} .

MATERIALES Y MÉTODOLOGÍA

Se utilizaron tráqueas de bovinos de raza cebú, holandés y suizo (principalmente de la raza cebú), machos de 350-400 Kg obtenidos del rastro de Temamatla, Edo. de México, transportadas al laboratorio de investigación en asma en una solución KRH con la siguiente composición (mM): NaCl 118, $NaHCO_3$ 25, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 1.2, $CaCl_2$ 2 y glucosa 11 (SIGMA ALDRICH St. Louis, USA) a una temperatura de 4°C y con una mezcla de carbógeno de la siguiente composición: 95% de O_2 y de 5% de CO_2 a un pH de 7.4.

Las células de MLVA de bovino fueron obtenidas a través de la siguiente metodología de disociación: Se cortaron aproximadamente 300 mg de tejido muscular de bovino, los cuales se colocaron en 5 ml de solución de Hanks (GIBCO, NY, EUA) que contenían 0.035 U/mL de papaína [56 mg/mL Worthington, NJ, EUA] y 2 mg de L-Cisteína (SIGMA ALDRICH St. Louis, USA) y se incubaron durante 10 min a 37°C. Posteriormente el tejido se lavó con KRH por triplicado para remover el exceso de la enzima y después fue incubado en 2 ml de medio Minimun Essential Medium (MEM, GIBCO, NY, EUA) por 2 min. Pasando dicho tiempo, el tejido se colocó en una mezcla de 5 mL de solución Hanks con 150 μ L de Liberasa (colagenasas) (ROCHE, Indianápolis, USA) mezcla que se separó en 2 fracciones de 2.5 mL cada una, la primer fracción se colocó sobre una parrilla de agitación magnética a 2 rps con una barra magnética (9 mm) a una temperatura de incubación de 37°C, durante 15 min, pasados los 15 min dicha fracción fue filtrada y el tejido fue colocado en la segunda fracción que se trató bajo las mismas condiciones de

agitación y temperatura que la primer fracción. En cada una de las fracciones, cada 5 min se tomaba una gota de la mezcla en agitación, la cual se colocó sobre un portaobjetos y se observó en el microscopio óptico con un objetivo de 10x para observar el avance en la disociación del músculo liso traqueal del cual se esperaba obtener células individuales. Al contar aproximadamente 25 células por campo, se retiraba la segunda fracción de la parrilla. Finalmente, la actividad enzimática se detuvo adicionando MEM, y se centrifugó por duplicado a 700 rpm durante 5 min.

Una vez obtenidas las células se incubaron con 15 μM de SBFI-AM (fluróforo específico para Na^+) y 0.075% de Ácido Plurónico a temperatura ambiente (22-25°C), con una solución KRH que contenía: (mM), Na^+ 0, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, glucosa 11, CaCl_2 2.0, para mantener la osmolaridad en las células se ajustó la concentración extracitoplasmática de Na^+ a 135 miliequivalentes con cloruro de colina, durante 3 h. Pasado el tiempo de cargado de las células con SBFI-AM se colocaron en una cámara de perfusión durante 30 min con el propósito de facilitar que las células se adhieran a la base de la cámara. Posteriormente, esta cámara fue colocada sobre un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon, Tokio, Japón) y las células adheridas al vidrio fueron perfundidas a un flujo de 2-2.5 ml/min con la solución Krebs descrita anteriormente libre de Na^+ . Se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con burbujeo constante de carbógeno 95% O_2 y 5% CO_2 para mantener el pH de 7.4 (Carbajal *et al.*, 2005).

Las células musculares lisas cargadas con SBFI-AM fueron excitadas con un haz de luz con dos longitudes de onda de excitación que corresponden a 340 y 380 nanómetros (nm), la luz emitida es colectada a 510 nm usando un microfluorómetro (Photon Technology Internacional, Modelo D-104, Princeton, NJ, EUA). La fluorescencia basal fue determinada automáticamente removiendo cualquier célula que se encontrara en el campo óptico del microscopio por donde pasa el haz de luz. Los datos obtenidos de la fluorescencia basal fueron almacenados en una computadora y analizados usando un programa de análisis (Félix v. 1.2.1, Photon Technology International, Princeton, NJ, EUA).

Mediciones de Na⁺ intracelular en miocitos traqueales de bovino.

Para comprobar si el Na⁺ está ingresando a las células, los miocitos fueron perfundidos en una solución KRH a diferentes concentraciones de Na⁺ (5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM y 135 mM). Los incrementos en la [Na⁺]_i fueron interpretados como un aumento en la fluorescencia para SBFI-AM (cociente 340/380).

En diferentes series de experimentos los miocitos fueron expuestos a Benzamil Amilorida (10 μM) y KB-R7943 (10 μM), se perfunde a la célula con un KRH 50 mM de [Na⁺]_e en un medio sin Ca²⁺ en presencia de dichos fármacos durante el segundo estímulo.

Permeabilidad a Na⁺ a través de los VDCC-L.

Demostramos por primera vez en ML traqueal de bovino, bajo condición de un medio sin Ca²⁺ que el canal VDCC-L también permite la entrada de Na⁺, realizando el siguiente protocolo experimental. Las células fueron perfundidas con un medio KRH 50 mM de Na⁺ sin Ca²⁺, después de 20 minutos de lavado de vuelve a dar un segundo estímulo a la célula con el KRH 50 mM de Na⁺ sin Ca²⁺, pero en presencia de Bay-K8644 (1 μM, activador de los VDCC-L). Debido a que el Bay-K8644 es un activador del canal y posiblemente incremente las [Na⁺]_i, se utilizará D-600 (30 μM), estrategia farmacológica que nos permitiría bloquear al VDCC-L, dicho fármaco fue preincubado 5 minutos antes de dar el segundo estímulo con KRH 50 mM de Na⁺ sin Ca²⁺ + D-600 en presencia de Bay-K8644.

Acople electromecánico: incrementos en $[Na^+]_i$ inducidos por la depolarización de la membrana plasmática cuando es estimulada con 80 mM de KCl.

Como se mencionó anteriormente, el estímulo con Bay-K8644 posiblemente posiblemente incremente las $[Na^+]_i$ debido a la apertura del VDCC-L, nosotros decidimos realizar otra maniobra experimental para confirmar dicho fenómeno, utilizamos KCl 80 mM (alta concentración de K^+), el cual va a despolarizar la membrana plasmática y promover la apertura del VDCC-L. Al miocito, lo perfundimos con 50 mM de Na^+ sin Ca^{2+} , posteriormente realizamos la misma maniobra que con Bay-K8644, pero ahora en presencia de KCl 80 mM

FÁRMACOS

Bay-K8644, el metoxiverapamil (D-600), SBFI2-AM, Benzamil Amilorida, KB-R7943. El SBFI-AM y el KB-R7943 fueron disueltos en DMSO, el D-600, la Benzamil Amilorida y el Bay-K8644 fueron disueltos en etanol.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las diferencias en el incremento de la fluorescencia de $[Na^+]_i$ fueron evaluadas mediante la aplicación de pruebas t de Student pareada para probar si la media estimada de la población por muestras dependientes difieren significativamente y no pareada para probar si las medias estimadas de la población por dos muestras independientes difieren significativamente. La significancia estadística se fijó a una $p < 0.05$ bimarginal. Los resultados, tanto en el texto como en las figuras, son expresados como promedio \pm error estándar de la media (ESM), la n corresponde al número de células.

RESULTADOS

Mediciones de $[Na^+]_i$

Curva concentración respuesta del Na^+ extracelular.

En célula única de músculo liso, se realizó una curva a diferentes $[Na^+]_e$, las cuáles fueron en múltiplos de 5 (5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM y 135 mM (concentración a la cuál se saturaba la señal de Na^+) (esta misma curva se realizó en espermatozoides humanos por Torres-Flores *et al.*, 2008) de Na^+ en estímulos únicos a un KRH libre de Na^+ y 2 mM de $[Ca^{2+}]_e$. Las respuestas fueron de menor a mayor concentración, las cuáles se observan como elevaciones sostenidas de fluorescencia al SBFI en el registro de cociente 340/380 (n=4 para cada concentración (**Fig. 7. A y B**). Este incremento en la fluorescencia al SBFI-AM se puede traducir como un incremento en las concentraciones intracelulares de Na^+ . En los siguientes experimentos usamos la concentración de 50 mM de Na^+ con el propósito de observar de forma evidente los efectos sobre la $[Na^+]_i$ inducidos por las diferentes condiciones experimentales propuestas anteriormente.

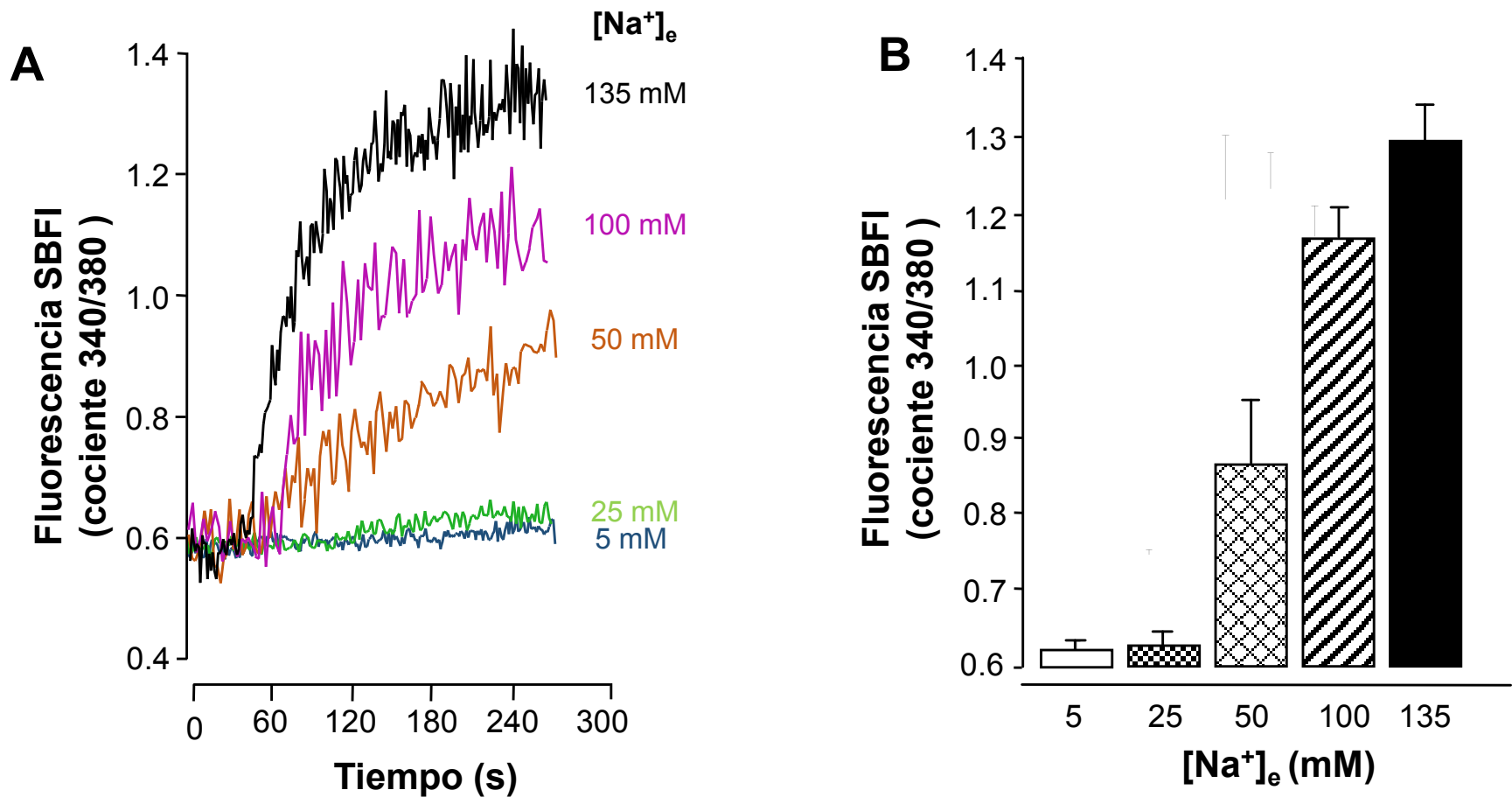


Fig. 7. A) Registros originales donde se muestra una Curva a diferentes concentraciones de $[Na^+]_e$. B) Gráfica de barras donde se muestran los incrementos en la fluorescencia a SBFI-AM dependientes de la $[Na^+]_e$ las cuáles fueron de 5, 25, 50, 100, 135 mM (n=4, para cada concentración).

El NCX es el responsable de introducir el Na^+ al citoplasma de los miocitos traqueales de bovino.

Las células fueron estimuladas con 50 mM de $[\text{Na}^+]_e$, el cual indujo un incremento lento en la señal de la fluorescencia a Na^+ . Una segunda estimulación con 50 mM de $[\text{Na}^+]_e$, produce una respuesta similar después de un lavado de 20 minutos. (n=4, Fig. 8. A y B).

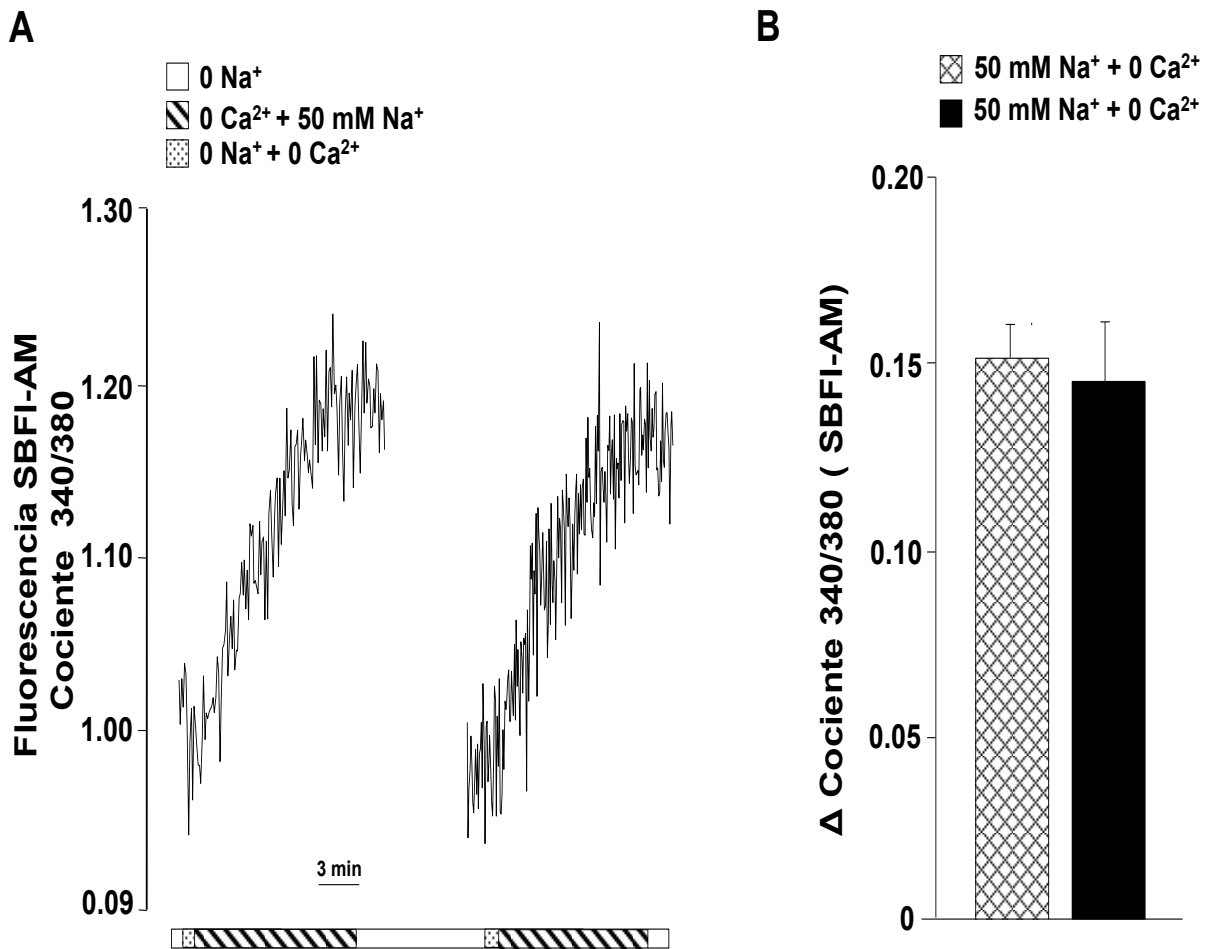


Fig 8 .A) Registro original donde se muestra que no hay ninguna modificación en la segunda señal de Na^+ (50 mM). **B)** Gráfica de barras mostrando que no hay diferencia significativa de la señal Na^+ (50 mM) en medio sin Ca^{2+} cuando se compara con el grupo control (n=4) *p< 0.05. Se utilizó la prueba t de Student pareada.

Como se había mencionado anteriormente el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) constituye uno de los mecanismos más importantes para expulsar Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular e ingresar Na^+ al citoplasma célula. (DiPolo & Beauge, 2006). Con el propósito de bloquear este mecanismo, las células fueron preincubadas con Benzamil Amilorida $10 \mu\text{M}$, 5 minutos antes del segundo estímulo con 50 mM de Na^+ extracelular. ($n = 4$, Fig. 9. A y B).

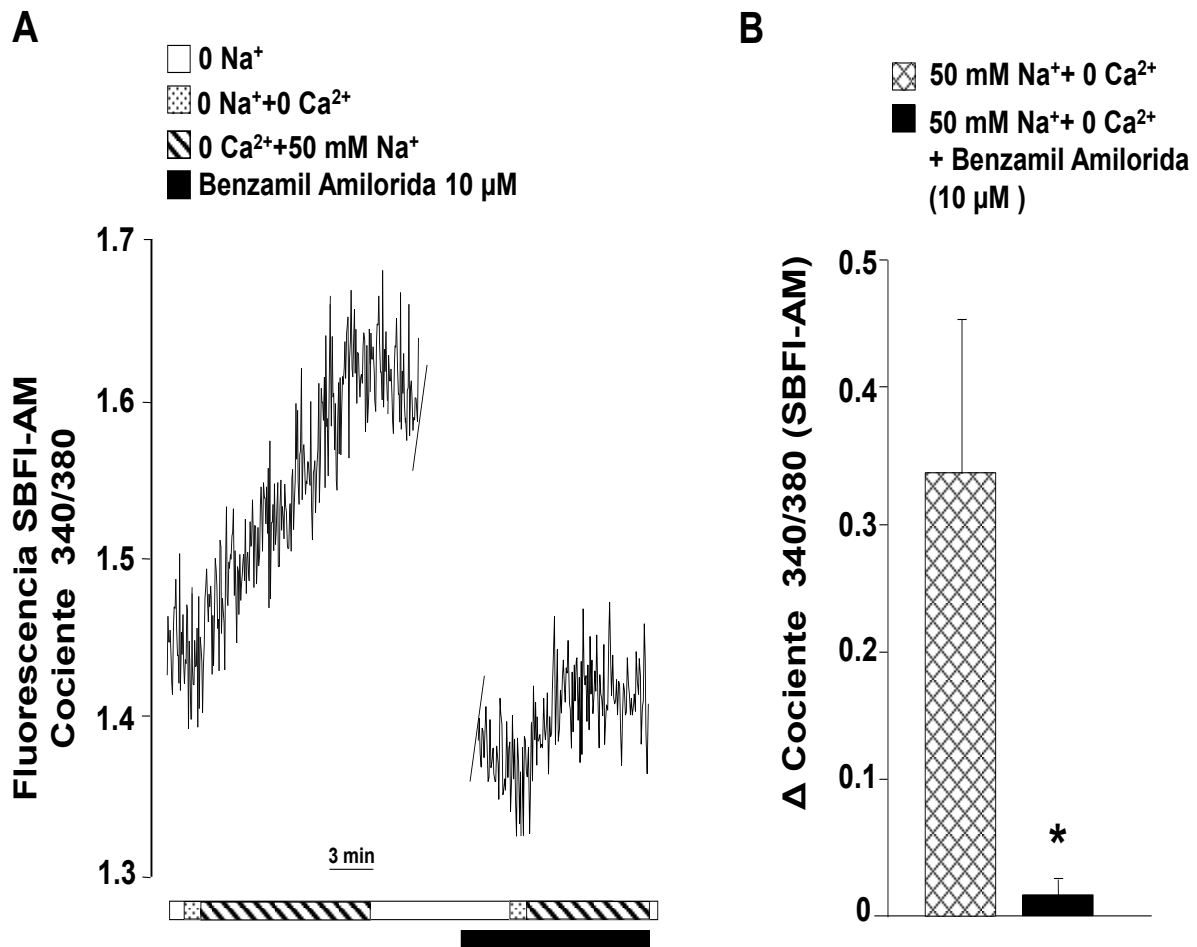


Fig 9 .A) Registro original donde se muestra la disminución de la señal de Na^+ (50 mM) en presencia de Benzamil Amilorida $10 \mu\text{M}$ en medio sin Ca^{2+} . **B)** Gráfica de barras mostrando la disminución significativa de la señal Na^+ (50 mM) ocasionada por la presencia de Benzamil Amilorida en medio sin Ca^{2+} . Cuando se compara con el grupo control se encontraron diferencias significativas ($n=4$) $*p < 0.05$. Se utilizó prueba t de Student no pareada.

Para confirmar los resultados anteriores, utilizamos KB-R7943 10 μM , inhibidor de ambas fase del NCX durante el segundo estímulo con 50 mM de $[\text{Na}^+]_e$ en un medio sin Ca^{2+} . En ambos casos se observó una disminución significativa de los incrementos de las $[\text{Na}^+]_i$ en las células. Estos resultados corroboran y demuestran que en células traqueales de bovino el mecanismo principal para introducir Na^+ al interior de las células, en condiciones basales, es a través del NCX en su forma normal ($n=4$, **Fig. 10. A y B**).

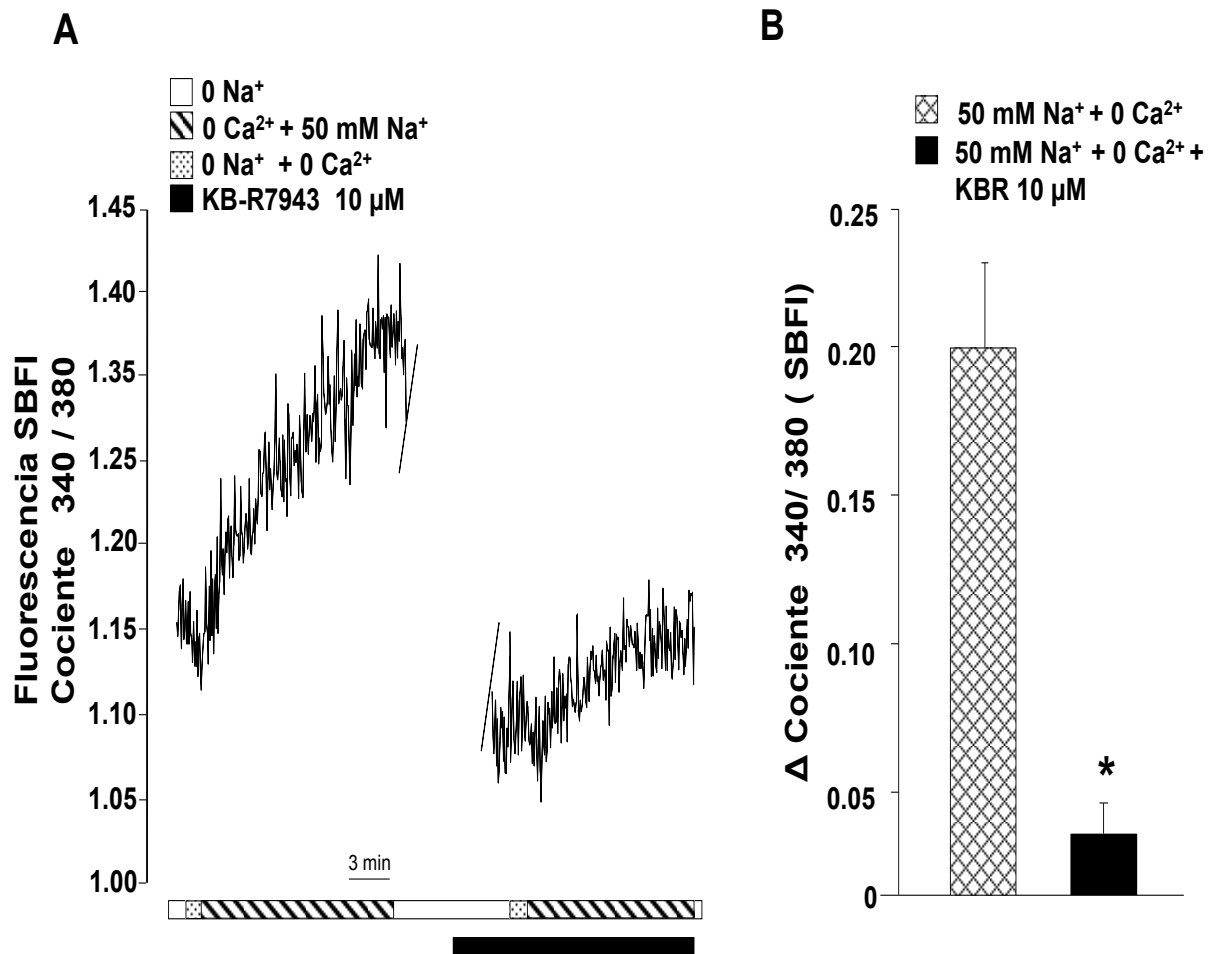


Fig. 10. A) Registro original donde se muestra la disminución de la señal de Na^+ (50 mM) en presencia de KB-R7943 10 μM en medio sin Ca^{2+} . B) Análisis estadístico del efecto sobre la disminución de la señal de Na^+ (50 mM) en presencia de KB-R7943 en medio sin Ca^{2+} . * $p < 0.05$ utilizando la prueba t de Student pareada.

Permeabilidad a Na⁺ a través de los VDCC-L.

En 1968 Keatinge encontró en ML vascular de oveja que el tejido se vuelve eléctricamente activo en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Posteriormente, en 1977, Prosser *et al.*, observaron en músculo liso circular intestinal de gato que la despolarización dependiente de Na⁺ fue abolida por verapamil y metoxiverapamil (D-600). En 1986, Hess *et al.*, reportan que la permeabilidad selectiva de los VDCC-L en células ventriculares de cobayo depende de la presencia de iones divalentes (Ca²⁺) en el medio. Debido a estos antecedentes, nosotros corroboramos por primera vez en musculo liso traqueal de bovino, bajo condición de un medio sin Ca²⁺ que el canal VDCC-L también permite la entrada de Na⁺.

En los resultados obtenidos se observó que las [Na⁺]_i se aumentaban significativamente con respecto a la primera respuesta (control) en presencia de Bay-K8644 en un medio sin Ca²⁺ (n=5, **Fig.11** A y B). Cuando se utiliza Bay-K8644 preincubado por 5 min y en presencia de D-600 obtuvimos como resultado que el aumento de las [Na⁺]_i producidas por la apertura del canal debido a la estimulación con Bay-K8466, se ven disminuidas y que la segunda respuesta se observa idéntica a su control (n=4, **Fig.12** A y B). Estos datos demuestran que la apertura del VDCC-L bajo estas condiciones permite la entrada de Na⁺ al interior del citoplasma, despolarizando a la célula y permitiendo que se traduzcan otras vías de señalización que nos lleven a incrementos de Ca²⁺, probablemente como lo propuesto por Liu *et al.*, en 2009 quienes encontraron en miocitos de ratón que la depolarización química y eléctrica de la membrana activaba al receptor M₃ sin el acople de su agonista natural, activando a la proteína Gq e induciendo la vía de la fosfolipasa C β (PLC β /fosfatidil inositol trifosfato, IP₃), con la subsecuente activación del RIP₃ y la liberación de Ca²⁺ del RS. Por otro lado, también demostraron que los receptores RyR₂ se activaban y se abrían para liberar Ca²⁺ del RS, bajo las mismas condiciones de un medio sin Ca²⁺.

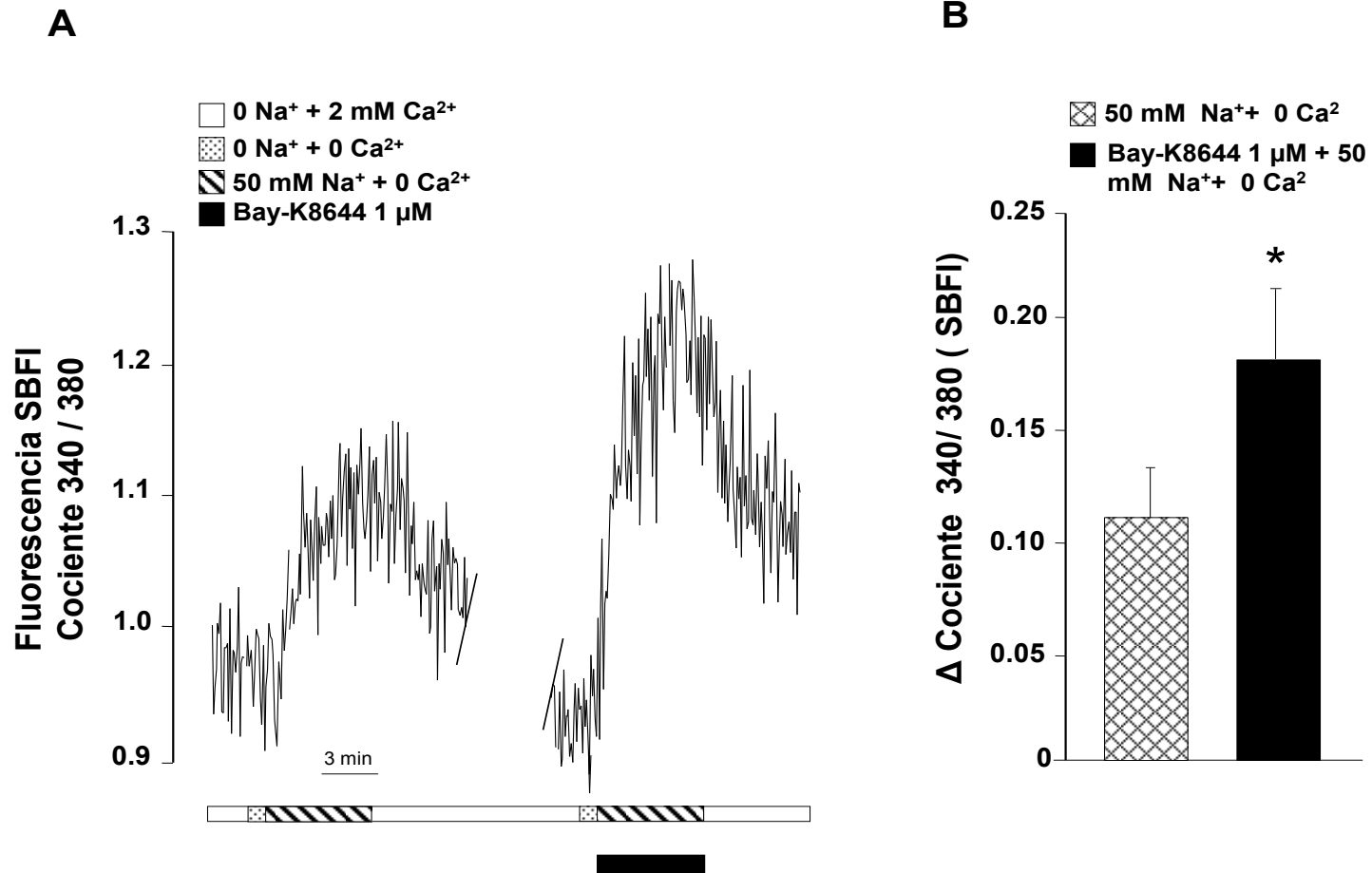


Fig. 11. A) Registro original donde se muestra el incremento de señal de Na⁺ (50 mM) en presencia de Bay K8644 (1 μM) en medio sin Ca²⁺. **B)** Gráfica de barras mostrando el efecto de Bay-K8644 sobre el incremento de Na⁺ en medio sin Ca²⁺ en miocitos traqueales de bovino. Cuando se compara con el grupo control se encontraron diferencias significativas *p< 0.05. Se utilizó una t de Student pareada.

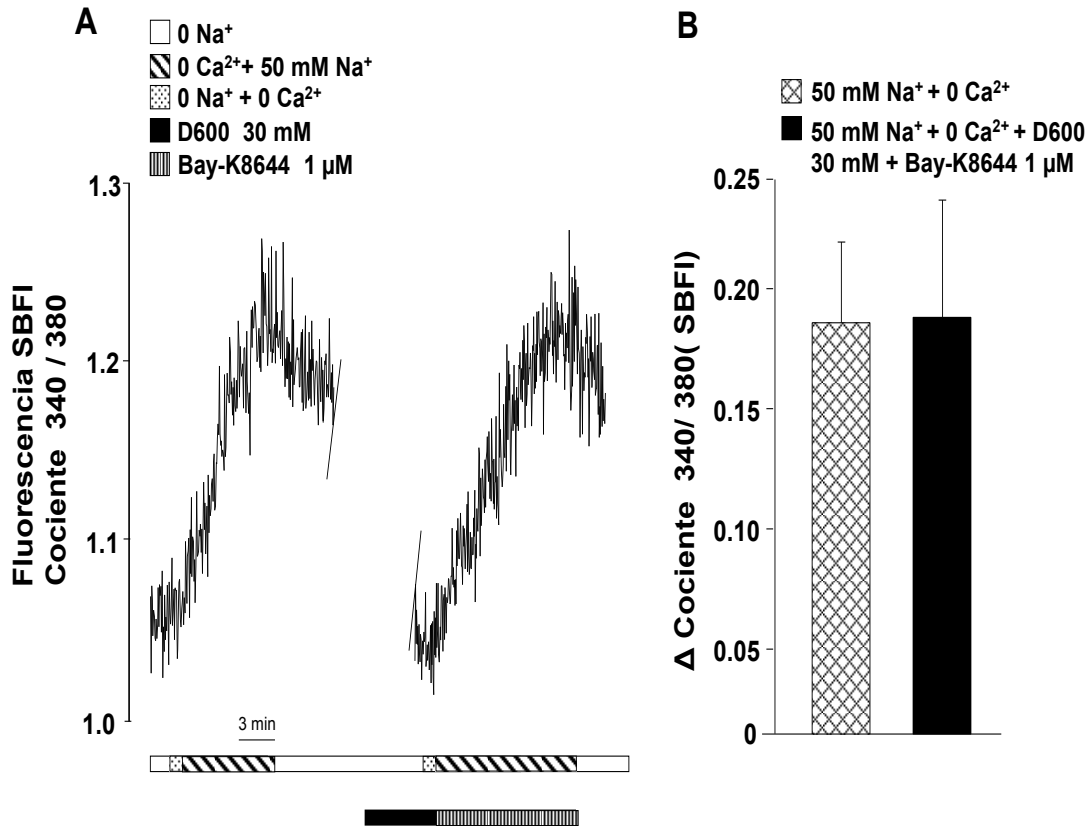


Fig.12. A) Registro original donde se muestra que el incremento por Bay-K8644 (1 μM) es bloqueado por D-600 (30 μM) bajo las mismas condiciones experimentales. B) Gráfica de barras donde se observa que el efecto de D-600 en presencia de Ba- K8644 en miocitos traqueales de bovino, cuando se compara con el grupo control no se encontraron diferencias significativas. Se utilizó la prueba t de Student pareada.

Este fenómeno de inespecificidad del VDCC-L, ha sido reportado en diferentes tejidos y bajo condiciones sin Ca²⁺, nosotros decidimos investigar que sucedía al canal cuando agregábamos Ca²⁺ 2 mM (condiciones normales). Las células fueron estimuladas con 50 mM de Na⁺, observando un incremento lento de las [Na⁺]_i (se observan deltas (Δ) más grandes). Posteriormente, las células fueron nuevamente estimuladas con 50 mM de Na⁺ pero en presencia de Bay-K8466, observando un aumento en las [Na⁺]_i cuando se abre al VDCC-L. Los resultados obtenidos fueron similares a los encontrados cuando se estimulaban en medio sin Ca²⁺. Estos datos

son muy interesantes ya que no existen reportes a la fecha que bajo condiciones normales el VDCC-L permita la entrada de algún otro ion. (n=6, **Fig. 13.** A y B).

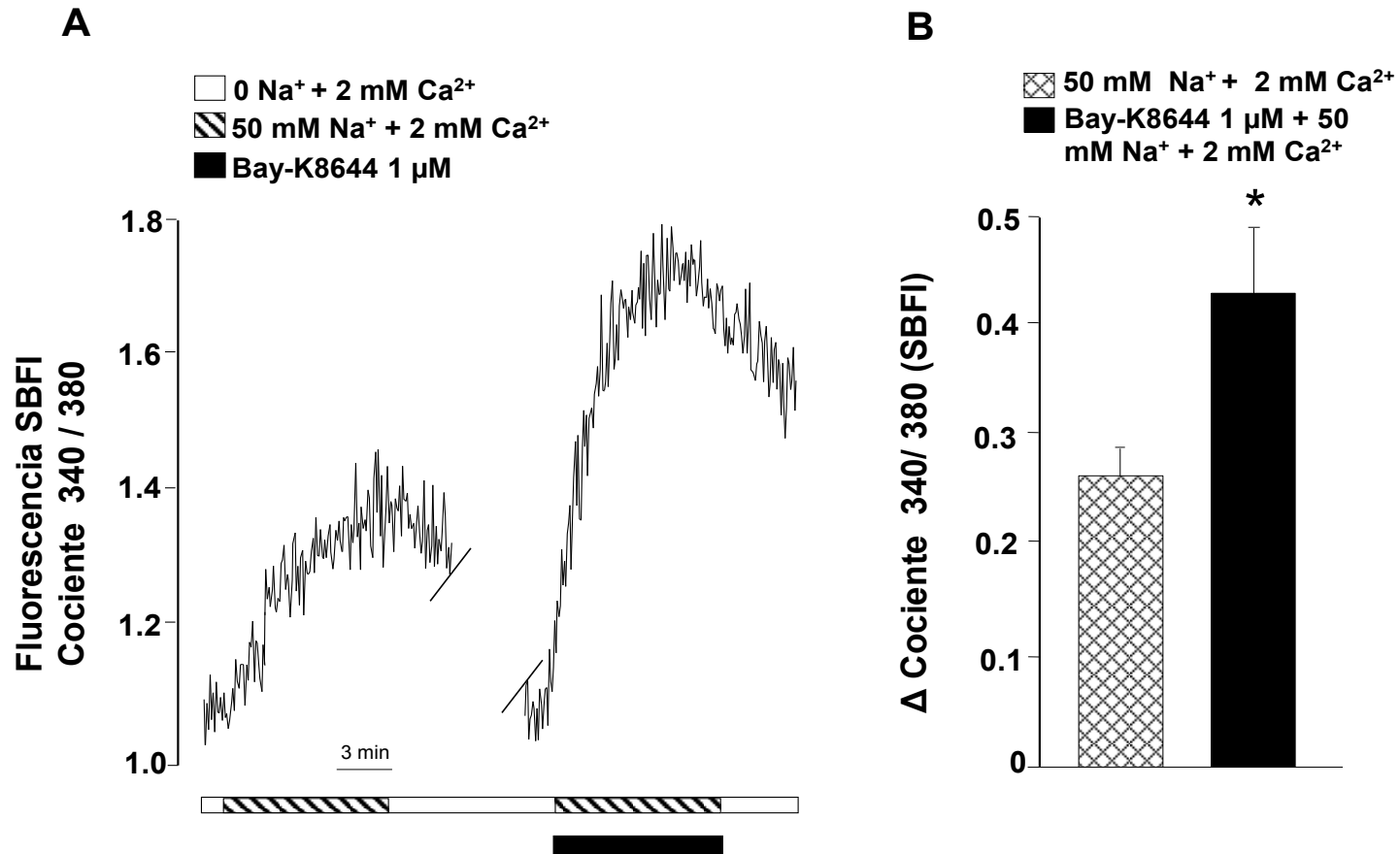


Fig. 13 A) Registro original donde se muestra el incremento de señal de Na⁺ (50 mM) en presencia de Bay-K8644 (1 μM) en medio con Ca²⁺. B) Gráfica de barras mostrando el efecto de Bay-K8644 sobre el incremento de Na⁺ en medio con Ca²⁺ en miocitos traqueales de bovino. Cuando se compara con el grupo control se encontraron diferencias significativas *p< 0.05. Se utilizó la prueba t de Student pareada.

Acople electromecánico: incrementos en $[Na^+]_i$ inducidos por la depolarización de la membrana plasmática cuando es estimulada con 80 mM de KCl.

Las células en presencia de KCl 80 mM (alto K^+) da como resultado un incremento significativo de las $[Na^+]_i$, comparado con la respuesta control. (n=6, **Fig.14** A y B). Estos experimentos son muy parecidos a los datos obtenidos al utilizar un activador del canal como el Bay-K8644, y respaldan la hipótesis de que bajo las condiciones experimentales utilizadas el VDCC-L permea Na^+ al interior de las células.

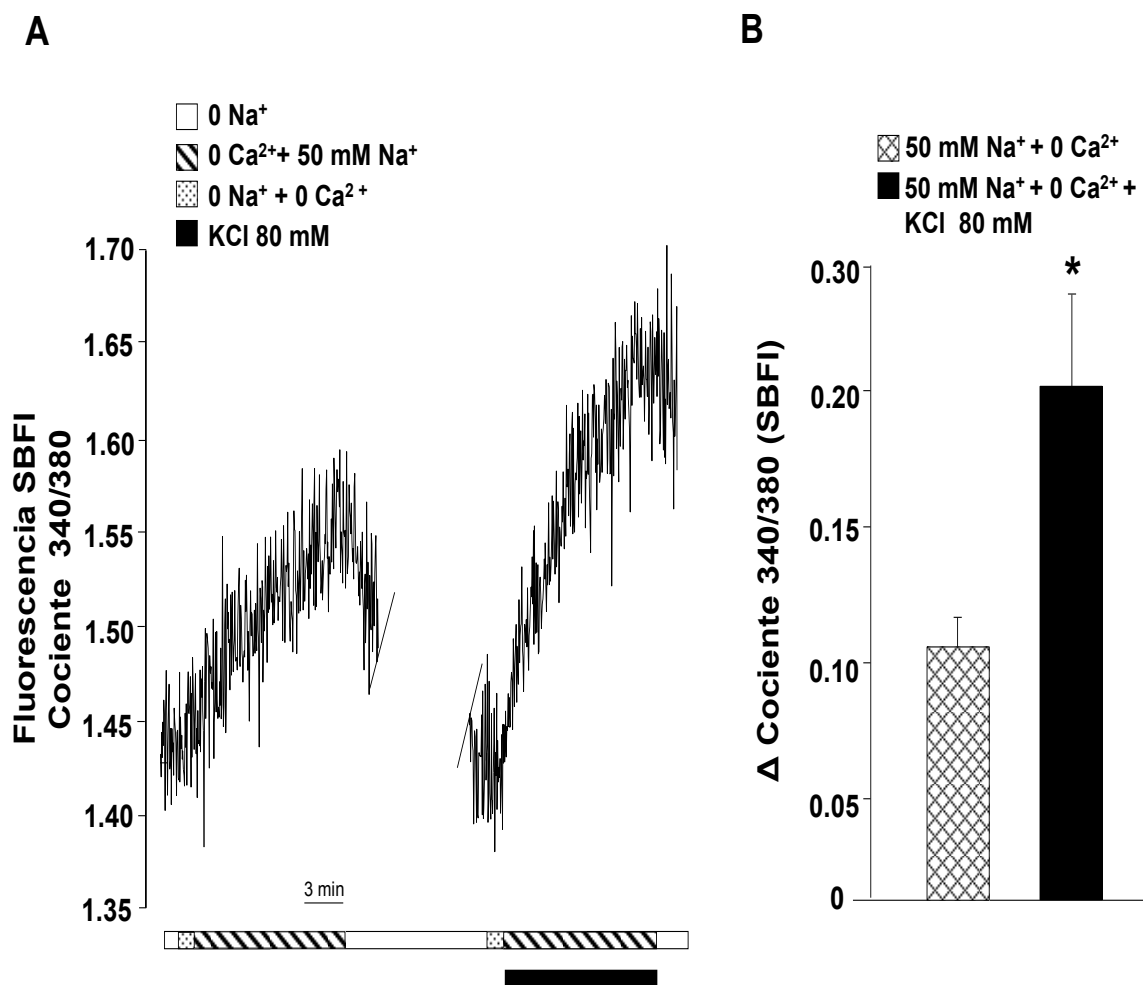


Fig. 14. A) *Registro original donde se muestra el incremento de señal de Na^+ (50 mM) en presencia de KCl (80 mM) en medio sin Ca^{2+} .* B) *Análisis estadístico del efecto de KCl (80 mM) (n=6) sobre el incremento de Na^+ en medio sin Ca^{2+} en miocitos traqueales de bovino, *p< 0.05, se utilizó la prueba t de Student pareada.*

DISCUSIÓN

En esta tesis encontramos que el Na^+ permea a través del VDCC-L en ausencia de Ca^{2+} en un medio KRH sin y con Ca^{2+} y que el mecanismo responsable de mantener las concentraciones basales de Na^+ es el NCX en su forma normal.

La permeabilidad del Na^+ a través de los canales de Ca^{2+} se ha estudiado ampliamente. Los primeros estudios en el músculo liso de arteria carótida de ovejas, establecieron que cuando se coloca el tejido en un medio sin Ca^{2+} este desarrolla una actividad eléctrica resistente a Tetrodoxina (TTX) y que es detenida cuando se elimina el Na^+ del medio. Posteriormente, en músculo liso intestinal circular de gato, la despolarización dependiente de Na^+ en un medio sin Ca^{2+} fue bloqueada por verapamilo y D-600, lo que demuestra que el Na^+ estaba ingresando a través de los VDCC-L cuando el Ca^{2+} estaba ausente en el medio.

Resultados similares fueron reportados en células ventriculares de cobayo, donde las corrientes de Na^+ en ausencia de Ca^{2+} en el medio se veían disminuidas, las cuales también fueron bloqueadas por antagonistas del VDCC-L e incrementadas en presencia de Bay-K8644. Resultados preliminares en el laboratorio utilizando músculo liso traqueal de bovino, corroboraron los hallazgos descritos previamente, ya que encontramos que el KCl inducía una contracción transitoria en un medio sin Ca^{2+} , que fue bloqueada por nifedipina e incrementada en presencia de Bay-K8644.

El hecho de que el Na^+ pueda permear a través del VDCC-L en condiciones normales de KH con Ca^{2+} es un hallazgo nuevo que nos puede indicar que la entrada de dicho ión a través de este canal es un mecanismo adicional que puede contribuir a la despolarización del MLVA durante la contracción.

Recientemente en células de músculo liso bronquiales de conejo se encontró un subtipo de canal de sodio, el Nav1.5, el cual produce una corriente de Na^+ dependiente de voltaje (Bradley *et al.*, 2013). Este canal, podría también contribuir a la despolarización de la membrana. Sin embargo, esta posibilidad fue descartada ya que se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones utilizadas (medio sin Ca^{2+}) donde se utilizó un bloqueador de dicho canal como es el TTX y donde no se observó alguna modificación sobre la contracción transitoria inducida por KCl

(**datos no mostrados**). La falta de participación de este canal podría estar relacionada con el potencial de reposo de la membrana del MLVA que es alrededor de -60 mV (Montaño *et al*, 1996) un voltaje en el que este canal se inactiva.

La permeabilidad de Na⁺ a través de VDCC-L se ha hecho en varios tejidos, incluyendo el músculo liso arterial, gastrointestinal y ventricular, pero bajo condiciones experimentales donde el Ca²⁺ estaba ausente, y cuando se añadía Ca²⁺, esta selectividad a Na⁺ se perdía. Sin embargo, en el MLVA esta selectividad inducida por Ca²⁺ parece no estar presente, proporcionando a este tejido una característica única que pudiera estar presente en otros músculos lisos todavía no estudiados como útero o vejiga.

Es importante mencionar lo que nos llevó a investigar en MLVA la inespecificidad de los VDCC-L, ya que hasta la fecha se pensaba que el VDCC-L solo era permeable al ión Ca²⁺. Sin embargo, estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que la estimulación con KCl en **medio sin Ca²⁺** producía una contracción transitoria de MLVA que era bloqueada por nifedipina. (Sommer *et al.*, 2015 enviado 1^{era} revisión).

El KCl se ha utilizado ampliamente para despolarizar el MLVA e inducir la apertura de VDCC-L para producir una contracción. Sin embargo, Liu *et al.*, en el 2009, encontraron que la despolarización de la membrana en células de ratón, implicaba vías de señalización adicionales, tales como la activación del receptor M₃ sin el acople de su agonista natural, activando a la proteína Gq e induciendo la liberación de Ca²⁺ del RS, vía la fosfolipasa C β /IP₃. Este incremento de Ca²⁺ es aumentado aún más a través del RyR₂ debido a un proceso inducido por la liberación de Ca²⁺ (Ca²⁺- libera Ca²⁺).

Estos mecanismos podrían explicar el hallazgo porque el KCl induce una contracción transitoria en un medio sin Ca²⁺, ya que dicha contracción también se vió disminuida en presencia de TMB-8 (**datos no mostrados**), el cuál es un antagonista de la liberación de Ca²⁺ mediada por IP₃. Esta respuesta también fue disminuida cuando el contenido de Ca²⁺ reticular fue agotado por cafeína y ácido ciclopiazónico (CPA, bloqueador de la ATPasa del RS, **datos no mostrados**). Sin embargo, los resultados obtenidos previamente en el laboratorio de que la

contracción transitoria fue significativamente disminuida en presencia de nifedipina y aumentada en presencia de Bay-K8644, no pueden explicarse por los hallazgos encontrados por Liu *et al.*, 2009. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que existe un mecanismo adicional involucrado en la respuesta transitoria inducida por KCl el cual probablemente implica la entrada de Na^+ a través del VDCC-L.

CONCLUSIONES

En miocitos traqueales de bovino:

- 1) El incremento en la fluorescencia para el SBFI se puede traducir en un incremento en la concentración intracelular de Na^+ ($[\text{Na}^+]_i$).
- 2) El NCX es el principal mecanismo por el cuál entra Na^+ al citoplasma celular en condiciones basales.
- 3) El canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L (VDCC-L), es permeable al ión Na^+ en miocitos traqueales de bovino en condiciones con y sin Ca^{2+} , cuando es activado por Bay-K8466 y KCl 80 mM.

Propuesta de la Tesis.

El aumento de Na^+ a través de este canal posiblemente sea para sostener la despolarización de la membrana durante la estimulación con un agonista en condiciones fisiológicas. Este fenómeno sería el primer reporte de la inespecificidad del canal bajo un proceso de contracción.

PERSPECTIVAS:

- 1) Realizar experimentos de Patch Clamp para corroborar la inespecificidad del VDCC-L, bajo las mismas condiciones experimentales.
- 2) Explorar en nuestro modelo experimental el mecanismo por el cuál se libera Ca^{2+} reticular en un medio 0 Ca^{2+} y la importancia del Na^{+} intracelular.
- 3) Utilizar estímulos más fisiológicos como agonistas colinérgicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bradley E, Webb TI, Hollywood MA, Sergeant GP, McHale NG, Thornbury KD. The cardiac sodium current Nav1.5 is functionally expressed in rabbit bronchial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Aug 15; 305(4):C427-35.
- Bazan-Perkins B, Carbajal V, Sommer B, Macias-Silva M, González M, Valenzuela F. and L.M Montaño. Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn Schm Arch Pharmacol* 1998 358(5): 567-573.
- Bazan-Perkins B, Flores-Soto E, Barajas-Lopez C, L.M Montaño. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion by caffeine and changes of $[Ca^{2+}]_i$ during refilling in bovine airway smooth muscle cells. *Arch of Med Res*. 2000; 31: 558-563.
- Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Carbajal V, Barajas-Lopez C, Montaño LM. Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2003; 368:277-83.
- Bernd Nilius, , René J M Bindels, and Guy Droogmans, Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca^{2+} channel ECaC. *J Physiol*. 2000 1; 527(Pt 2): 239–248.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium Signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2003; 4: 517-529
- Billington C, Penn R. Signaling and regulation of Gprotein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir Res*. 2003; 4:1-23.

- Bordallo C, Rubín JM, Varona AB, Cantabrana B, Hidalgo A, Sánchez M. Increases in ornithine decarboxylase activity in the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of the rat. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jun 22;422(1-3):101-7.
- Borreau JP, Abela AP, Kwan CY, Daniel EE. Acetylcholine Ca^{2+} stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol Cell Physiol* 1991; 261:C497-C505.
- Bruce P Bean. Calcium Channels. *Encyclopedia of life sciences.* Nat Pub Group. 2001
- Campos-Bedolla P., Vargas MH, Segura P, Carbajal V, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Barajas-López C, Mendoza-Patiño N, Montaña LM. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT(2A) receptors: role of Na^{+}/K^{+} -ATPase pump and Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Life Sci.* 2008 Sep 12;83(11-12):438-46
- Carbajal V. (1998). Contracción bronquial sostenida en un medio sin calcio: participación del trifosfato de inositol. Tesis de Maestría en Ciencias biomédicas. UNAM.
- Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaña LM. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca^{2+} pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288:84-92.
- Catterall WA, 1993. Structure and modulation of Na^{+} and Ca^{2+} channels. *Ann NY Acad Sci.* 707, 1-19.
- Catterall WA, Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16:521-55.

- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels *Pharmacol Rev.* 57:411–425, 2005 International Union of Pharmacology. XLVIII.
- Clapham DE. Calcium Signaling, Review. *Cell.* 1995;80:259-268
- Cobar L, Cruz- Valderrama JE, Montaña LM, Flores-Soto E. Importancia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación de Ca^{2+} del músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax* 2010; 1:39-45.
- DiPolo R, Beaugé L. Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiol Rev* 2006; 86: 155-203.
- Edes I, Kranias EG. Ca^{2+} -ATPases/pumps. In: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers.* 2nd ed. New York: Academic press; 1998. p.225-236.
- Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Chavez J, Barajas-López C, Montaña LM. PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2011; 15; 674(2-3):439-44.
- Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Montaña LM. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} refilling is determined by L-type Ca^{2+} and store operated Ca^{2+} channels in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2013 5;721(1-3):21-8.
- Floyd R, Wray S, Calcium transporters and signalling in smooth muscles, *Cell Calcium.* 2007 Oct-Nov;42(4-5):467-76.

- Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J.Physiol* 1970; 209:25-43.
- Hess P, Lansman JB, Tsien RW. Calcium channel selectivity for divalent and monovalent cations. Voltage and concentration dependence of single channel current in ventricular heart cells. 1986;88(3):293-319
- Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reversemode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007; 30: 269- 278.
- Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 967-1003.
- Janssen L, Tazzeo T, Zuo J, Pertens E y Keshavjee S, 2004. KCl evokes contraction of airway smooth muscle via activation of RhoA and Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287, L852-L858.
- Keatinge WR. Sodium flux and electrical activity of arterial smooth muscle. *J Physiol.* 1968 Jan; 194(1):183-200.
- Kotlikoff MI. Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1998; 254: C793-C801.
- Liu C, Zuo J, Pertens E, Helli P y Janssen L, 2005. Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289 (4),L574-L582.
- Liu QH, Zheng YM, Korde AS, Yadav VR, Rathore R, Wess J, Wang YX. Membrane depolarization causes a direct activation of G protein-coupled receptors leading to local Ca^{2+} release in smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jul 7;106(27):11418-23.

- Mastuda T, Takuma K, Baba A. $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol*, 1997; 74: 1-20.
- Montaña LM, Barajas-Lopez C, Daniel EE. Canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free medium: role of intracellular Ca^{2+} . *Can J Physiol Pharmacol*. 1996 Nov; 74(11):1236-48.
- Montaña LM, Carbajal V, Arreola JL, Barajas-López C, Flores-Soto E, Vargas MH. Acetylcholine and tachykinins involvement in the caffeine-induced biphasic change in intracellular Ca^{2+} in bovine airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 2003 Jul; 139(6):1203-11.
- Montaña LM, Bazán Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005; 83:717-723.
- Pessah IN, Stambuck RA, Casida JE. Ca^{2+} activated ryanodine binding: Mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine and adenine nucleotides, *Mol Pharmacol*. 1987; 31: 232-238.
- Ratz P, Berg K, Urban N y Miner A. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 288 (4), C769-C783.
- Reyes García J. (2013) Participación de los canales de Ca^{2+} tipo L y el intercambiador $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ en el relleno de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico en el músculo liso traqueal de cobayo. Tesis de Maestría en Ciencias biológicas. UNAM.
- Rueda A, García L, Guerrero-Hernández A. Luminal Ca^{2+} and activity of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps modulate histamine-induced all-or-none Ca^{2+} release in smooth muscle cells. *Cellular Signalling*. 2002; 14:517-527.

- Scragg JL, Dallas ML, Peers C. Molecular requirements for L-type Ca²⁺ channel blockade by testosterone. *Cell Calcium*. 2007 Jul; 42(1):11-5.
- Secondo A, Pannaccione A, Molinaro P, Ambrosino P, Lippiello P, Esposito A, Cantile M, Khatri PR, Melisi D, Di Renzo G, Annunziato L. Molecular pharmacology of the amiloride analog 3-amino-6-chloro-5-[(4-chlorobenzyl)amino]-n-[[2,4-dimethylbenzyl)-amino]iminomethyl]-pyrazinecarboxamide (CB-DMB) as a pan inhibitor of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in stably transfected cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; 331(1):212-21.
- Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003 Oct; 83(4):1325-58.
- Smyth JT, Hwang SY, Tomita T, DeHaven WI, Mercer JC, Putney WJ. Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med*. 2010; 14: 2337-2349.
- Torres-Flores V, Picazo-Juárez G, Hernández-Rueda Y, Darszon A, González-Martínez MT. Sodium influx induced by external calcium chelation decreases human sperm motility. *Hum Reprod*. 2011 Oct; 26(10):2626-35
- Wu S, Moore Tm, Brough GH, Whitt SR, Chinkers M, Li M, Stevens T. Cyclic nucleotide-gated channels mediate membrane depolarization following activation of store-operated calcium entry in endothelial cells. *L Biol Chem* 275: 188887-188886, 2000.
- Zhang ZD, Kwan CY, Daniel EE. Identification of Ca²⁺-release channels in smooth muscle and isolated membranes *Biol Signals*. 1993; 2(5):284-92.