

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P



Regulación de los Canales de Calcio por Dihidropiridinas en Corazón de Rata

TESIS
No 1016-

Tesis Doctoral
Patricio Eduardo Morgan
La Plata, 2001

REGISTRO DE DONACION.....
A.....
Fecha. 09-10-03
Inv. B..... Inv..... B 57092

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata ha sido realizado en la Cátedra de Fisiología con Biofísica de la facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de la Plata bajo la dirección de la Dra. Gladys E. Chiappe de Cingolani y el asesoramiento científico de la Dra. Angela Grassi.

Agradecimientos:

- A mi directora, la Dra. Gladys E. Chiappe de Cingolani por su guía y permanente incentivo en mi trabajo de Tesis Doctoral.
- A la Dra. Alicia Mattiazzi por su esfuerzo y dedicación que hicieron posible este trabajo.
- Al Dr. Horacio E. Cingolani por haberme brindado la posibilidad de desarrollar el presente trabajo en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares.
- A la Dra. Angela Grassi por haber aceptado la responsabilidad de ser mi Asesor Científico y por su interés en el avance de mi trabajo de Tesis.
- A mis compañeros de trabajo, por sus consejos, apoyo y colaboración.
- A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, la Fundación Antorchas y la Facultad de Ciencias Médicas que brindaron los medios y el lugar para realizar este trabajo.
- A mi familia, que siempre fue un apoyo incondicional y fuente de energía.

INDICE

INTRODUCCION	1
1)- Biología celular y molecular del músculo cardíaco	1
a) Estructura y Ultraestructura del miocito	2
b) Organización molecular del Sistema contráctil	4
i- Filamentos finos	4
ii-Filamentos gruesos	8
2)- Mecanismo de contracción muscular	10
a) Alteración de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos	14
3) Acoplamiento Excito-Contráctil	16
a) Introducción	16
b) Canales de calcio voltaje dependientes	17
c) Receptor de Ryanodina	22
d) Liberación de calcio inducida por calcio	24
e) Relajación del miocardio	26
4)- Bloqueantes de los canales de calcio	27
a) Dihidropiridinas	28
b) Bases estructurales de la unión de DHPs a los VDCC tipo L	29
c) Aspectos bioquímicos del tratamiento crónico con DHP	30
 OBJETIVOS	 32
 MATERIALES Y METODOS	
1- Animales y diseño experimental	33
2- Extracción del corazón	34
3- Aislamiento de miocitos	35
4- Preparación de membranas cardíacas	37
5- Determinación de proteínas	38
6- Radioensayo de union al receptor de DHP	39
7- Medidas de "transient" de calcio	40

RESULTADOS

a) Características generales de los animales	45
b) Densidad de los canales de Ca ²⁺ tipo L	46
c) Medida de acortamiento y "transients" de calcio	49

DISCUSIÓN	58
------------------	----

BIBLIOGRAFÍA	67
---------------------	----

INTRODUCCIÓN

El aumento de la concentración de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) desempeña un rol principal en la fisiología cardiovascular. La principal vía que permite la entrada de Ca^{2+} a la célula es a través de la activación de canales de calcio específicos operados por voltaje (canales L). Los antagonistas de los canales de calcio (44,55,65) se han usado clínicamente en el tratamiento de trastornos cardiovasculares para bloquear los canales y evitar así la entrada de calcio a la célula. Sin embargo, los efectos del tratamiento crónico con nifedipina, un antagonista de los canales de calcio perteneciente al grupo de las dihidropiridinas (DHP), sobre la función cardíaca son contradictorios. A pesar del efecto hipotensor durante el tratamiento crónico con DHP (99), se ha descrito que la función cardíaca no cambia (43), que existe una leve disminución (56) o aumenta (100). Es razonable esperar que la administración crónica con bloqueantes de los canales de calcio produzca cambios en las características funcionales de los canales de calcio cardíaco y en consecuencia de la actividad mecánica.

1. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL MÚSCULO CARDÍACO

Desde el punto de vista histológico el corazón está constituido por varios tipos de células, tales como fibroblastos, células epiteliales y miocitos o células musculares estriadas especializadas del miocardio. Entre estas últimas se encuentran principalmente las propias células contráctiles del ventrículo y aurícula (57). Los miocitos se encuentran

unidos entre sí a través de los discos intercalares, formando una compleja red tridimensional que permite a las células estar acopladas eléctricamente y en consecuencia, la adecuada contracción del tejido. De esta manera el miocardio, si bien no es un verdadero sincicio anatómico, se comporta como un sincicio funcional.

a) Estructura y ultraestructura del miocito

Los miocitos son células especializadas en la contracción debido a que han logrado una diferenciación ultraestructural particular. El 47% del volumen celular está constituido por miofibrillas que permiten el desarrollo del proceso mecánico de contracción, el 36% del volumen por mitocondrias que permiten la provisión adecuada de ATP y el resto del volumen está ocupado por los componentes normales de una célula (57). La observación de un miocito al microscopio óptico permite el reconocimiento de estriaciones o bandas, oscuras (A) y claras (I), perpendiculares al eje longitudinal del mismo, que se van alternando entre sí (Figura 1A). El microscopio electrónico permitió reconocer nuevas bandas, como la banda H y la línea Z. Este patrón de bandas característico, está determinado por la composición y disposición que ocupan las miofibrillas. Éstas están compuestas por dos clases de filamentos proteicos que interdigitan entre sí de una manera fija para constituir los miofilamentos gruesos compuestos por miosina (15 nm) y los miofilamentos delgados compuestos fundamentalmente por actina (7 nm).

Estos miofilamentos están organizados en unidades funcionales, que se repiten a lo largo de la miofibrilla, conocidas como sarcómeros de 1.6 a 2.2 μm de longitud (Figura 1B).

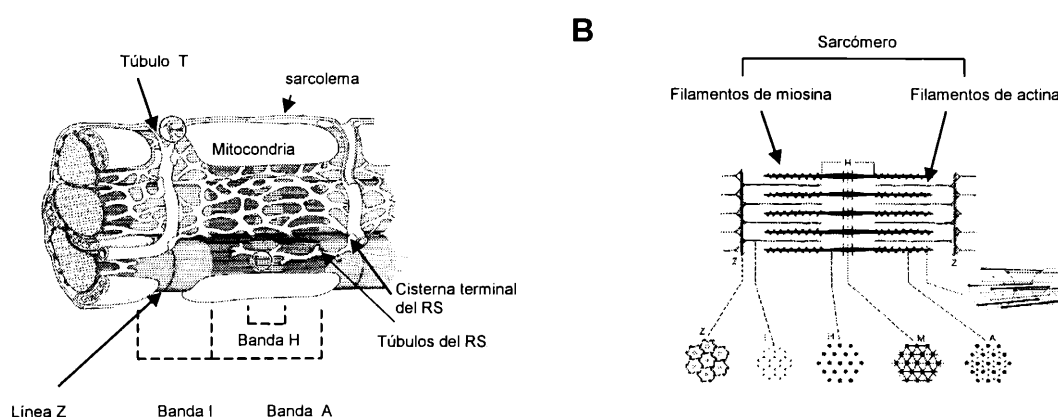


Figura 1. A. Estructura y ultraestructura del miocito. B. Corte transversal a nivel de las distintas bandas

La diferenciación del miocito como una célula especializada en la contracción no sólo está dado por el desarrollo de las miofibrillas, sino también por el desarrollo especial de la membrana plasmática y el retículo sarcoplasmático.

Membrana Sarcolemal (MS). En esta membrana se han desarrollado invaginaciones tubulares, llamado sistema de túbulos T, que corren a lo largo de las líneas Z, y que pueden además correr longitudinalmente por más de un sarcómero. Este sistema de túbulos T extiende el espacio extracelular hacia el interior y permite que el estímulo eléctrico o potencial de acción (PA) se propague a zonas profundas del miocito. De esta forma se permite que todas las miofibrillas de un miocito se contraigan, rápidamente y en forma sincrónica, inmediatamente después de la despolarización del sarcolema.

Retículo Sarcoplasmático (RS): Este se ha especializado como depósito de Ca^{2+} , del que se puede disponer en gran cantidad y rápidamente. El RS tiene una región adyacente a la membrana de los túbulos T o a la MS, llamada cisternas subsarcolemales. Aunque no existe un contacto físico entre ellas, esta cercanía permite vincular la entrada de Ca^{2+} durante el PA que se propaga por la MS, con la liberación del Ca^{2+} desde el RS necesario para la contracción.

b) Organización Molecular del Sistema Contráctil

a) Filamentos finos

Los filamentos finos se encuentran alineados a lo largo de la célula y están constituidos por varias proteínas como actina, tropomiosina y troponina (Figura 2).

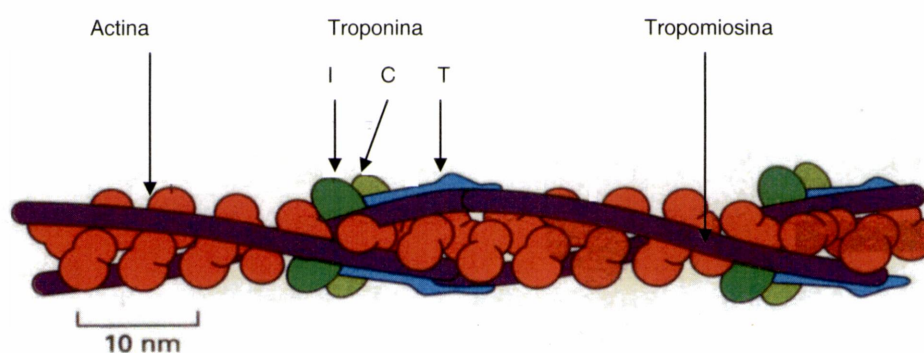


Figura 2. Filamento delgado

La **actina** (A) se puede encontrar libre como un monómero de forma globular (actina G) o como un polímero fibroso (actina F) constituido por la asociación entre sí de actina G, siendo así como se la encuentra en

los miofilamentos. La actina G consta de dos dominios globulares del mismo tamaño aproximadamente, separados por una profunda hendidura que limita un sitio con actividad de ATPasa. A partir de los estudios de la actina F con difracción con rayos X y microfotografías electrónicas se propuso un modelo en el que las subunidades G se organizan helicoidalmente de manera que cada una se encuentra rodeada por otras cuatro (64) (Fig 3B). La imagen magnificada del conjunto del filamento da la impresión de estar formada por dos hebras de bolillas que se enrollan entre sí formando una estructura en cordón (Fig. 3A).

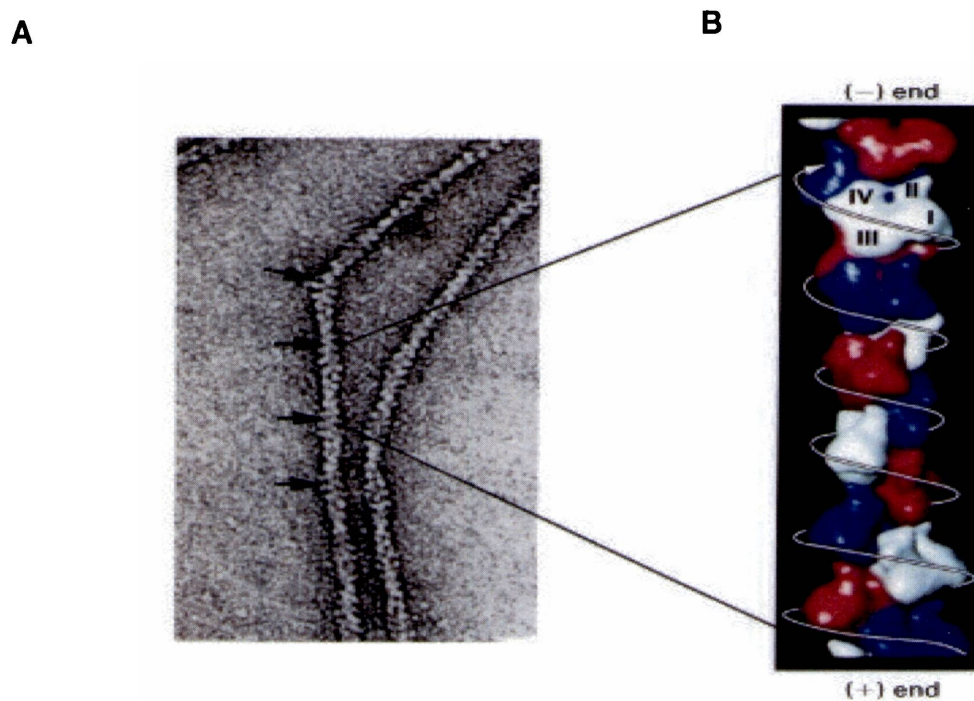


Figura 3. Filamento de actina F

El filamento de actina F se caracteriza por tener polaridad intrínseca, dada por cada subunidad de actina G que se une a la siguiente de una manera predeterminada.

La **tropomiosina** (Tm) es una proteína de 70 kd alargada, de estructura fibrosa de ~40 nm de longitud, formada por dos subunidades alfa hélice que se enroscan entre sí formando una hélice estabilizada a través de interacciones hidrofóbicas y un enlace disulfuro. Esta proteína se ubica longitudinalmente sobre la periferia del filamento de actina F, solapándose los extremos de Tm contiguas entre sí ("cabeza con cola"), generando una continuidad a lo largo del mismo (Figura 2). Esta región se caracteriza por una gran flexibilidad e importancia en la contracción, dado que la activación del filamento delgado implica el movimiento de la Tm. Cada molécula de tropomiosina posee siete sitios de unión a los monómeros de actina (64) que permite estabilizar y dar rigidez al filamento (7). Sin embargo desde el punto de vista de la activación del filamento no todas las moléculas de actina, cubiertas por la Tm, serían equivalentes (62,70). La fuerza de la unión Tm-A está influenciada por distintos factores:

- 1) Variaciones en la unión a la actina
- 2) La interacción con la siguiente Tm
- 3) La interacción con troponina y miosina.

La **troponina** (Tn) es un complejo de tres pequeñas proteínas. La *troponina C* (18 kd) que fija el Ca^{2+} , la *troponina I* (24kd) que se une a la actina e inhibe la ATPasa de la actomiosina, y la *troponina T* (37kd), una

proteína alargada, que une el complejo de Tn a la Tm (Figura 2). El complejo de la troponina queda localizado en los filamentos delgados a intervalos de aproximadamente 40 nm, distancia establecida por la longitud de la tropomiosina.

La *troponina C* (TnC) es estructuralmente parecida a la calmodulina y también muy sensible al calcio. Consta de dos dominios globulares homólogos conectados por una alfa hélice. El dominio carboxilo contiene dos centros de alta afinidad por el calcio mientras que en el extremo amino terminal, para la isoforma cardíaca solo existe uno, con menor afinidad pero más selectivo por el calcio. En el músculo en reposo los sitios de alta afinidad están ocupados pero no así el de baja afinidad. Cuando el calcio se libera del RS ocupa los sitios de baja afinidad induciendo un cambio en la proteína que afecta a los otros componentes del complejo de Tn y a la Tm.

La unión de la *troponina I* (TnI) a la actina permite regular de forma sensible al Ca^{2+} la unión del complejo de Tn y Tm a la actina. La TnI, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es menor de 10^{-7} M, permite la unión electrostática del complejo de troponinas a la actina inhibiendo la interacción entre actina y miosina. Por otro lado, cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta a $\sim 10^{-5}$ M, la unión del Ca^{2+} a la TnC, favorece la unión TnC-TnI y simultáneamente desfavorece la interacción TnI-A. Así durante el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la sístole la actina queda liberada para interactuar con la miosina y generar la contracción.

La *troponina T* (TnT) es una molécula en la que se pueden distinguir una región COOH terminal globular y otra NH₂ terminal filamentosa que yace sobre la Tm. Se ubica sobre la región de solapamiento “cabeza-cola” de las Tm, pudiendo influenciar tanto la flexibilidad de la Tm como el acoplamiento de movimientos de Tm vecinas. La TnT cumpliría con varias funciones (40):

- 1) Mantener la cohesión del complejo Tn-Tm-A: Por que permite la unión del complejo TnC-TnI al complejo Tm-A y coopera en la unión de Tm-A.
- 2) Ayudar a determinar la posición de la Tm sobre la A dado que la movilidad de la Tm es afectada: a) por su interacción con la TnT y b)secundariamente por la interacción de la TnT con la TnC-TnI que es modulada por el Ca²⁺ (77).

b) Filamentos gruesos:

La **miosina** (M) del músculo pertenece a una familia de proteínas, constituida por mas de diez clases diferentes de miosinas. La miosina del músculo o clase II (64) es una molécula compleja constituida por dos cadenas proteicas pesadas de 200 kd y dos cadenas peptídicas livianas de ~20 kd.

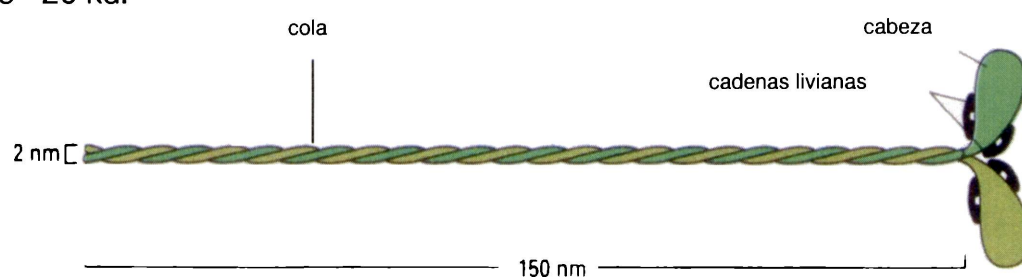


Figura 4. Molécula de miosina

En el miocardio se encuentran isoformas, producto de la combinación de cadenas pesadas diferentes, como por variaciones en las cadenas livianas. En la cadena pesada se distinguen un dominio fibroso, largo, de estructura de α -hélice, correspondiente al extremo COOH terminal y otro globular correspondiente al NH₂ terminal. Los dominios α -hélice de las cadenas pesadas se enrollan entre sí para formar la cola filamentosa y el cuello de la miosina. La cabeza de la miosina posee un sitio de unión a la actina, así como un sitio catalítico para la hidrólisis de ATP, conformando la base molecular de los puentes cruzados o transversales. Al considerar el filamento grueso entero, se observa que está constituido por un conjunto de moléculas de M (oligómero) que se agregan por las colas con las cabezas de cada molécula proyectándose hacia afuera. Por cada cadena pesada hay dos cadenas livianas, ubicadas a la altura del cuello de la miosina llamadas *cadena liviana esencial* y *reguladora*. Ambas son proteínas fijadoras de calcio similares a la calmodulina, aunque con afinidades distintas por el calcio. La actividad ATPasa de la miosina puede ser modulada por estas cadenas que también son sustrato de fosforilación de kinasas (PKA).

El filamento grueso se caracteriza por su bipolaridad, dada por las cabezas que apuntan hacia las líneas Z del sarcómero. Es decir que en la mitad del sarcómero el sentido de la molécula se invierte, y por este motivo el centro del mismo está desprovisto de las cabezas de miosina y se lo conoce como *región vacía o lisa*.

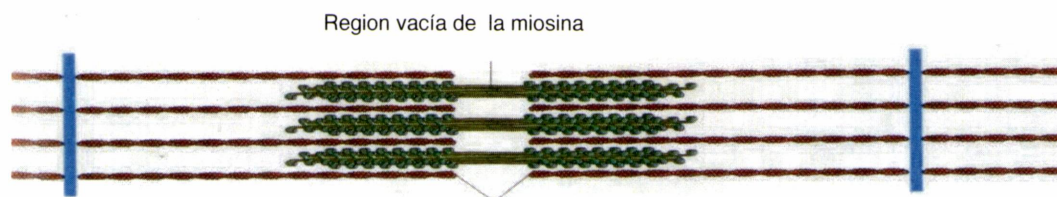


Figura 5. Filamentos de miosina y actina en el sarcómero

En el filamento grueso se encuentran otras proteínas, tales como la *proteína C, H, X* que pueden modular la actividad contráctil. La proteína C puede modular la activación por calcio (92) actuando sobre los filamentos gruesos (67,75,91).

Un tercer sistema de filamentos del miocito está constituido por una proteína fibrosa conocida como *titina o conectina* de 2700 kd y de $\cong 1\mu\text{m}$ de largo que se extiende a lo largo del sarcómero. Este sistema permitiría mantener el filamento centrado durante la contracción y recuperar la longitud normal luego de que el sistema es estirado, proveyendo elasticidad al sistema.

Se han descrito otras proteínas menos conocidas que juegan un papel estructural como *Cap Z, tropomodulina y actinina*.

2 MECANISMO DE CONTRACCIÓN MUSCULAR

El proceso de contracción es un proceso de transformación de energía, por el cual la energía almacenada como ATP se libera produciendo cambios conformacionales en las proteínas, que terminan generando los movimientos de deslizamiento.

Si bien todavía no están claros con precisión cómo se efectúan y cómo son controlados los pasos para el desarrollo de la contracción, existen numerosos modelos de regulación de la interacción A-M, categorizados sobre la base de los métodos usados para formularlo, ya sea estructurales, bioquímicos o fisiológicos. Cada uno de ellos describe un aspecto específico de la regulación, por lo que no son capaces de proveer un único cuadro completamente satisfactorio. A pesar de ello existe un modelo clásico propuesto por Huxley (1954) (52,53) conocido como *teoría del deslizamiento de los filamentos* (Figura 6) y confirmado posteriormente por numerosos experimentos, que describe básicamente la contracción muscular (24). En este modelo la contracción muscular, es el resultado del movimiento de los filamentos delgados sobre los gruesos hacia el centro del sarcómero. Cada uno de los sarcómeros, y en consecuencia el músculo, se acorta aunque la longitud de los miofilamentos no se modifique. El movimiento se produce a través de una interacción cíclica entre las cabezas de miosina y la actina (puentes transversales) asociado a la hidrólisis de ATP. En la Figura 6 se describe en forma esquemática y simplificada el ciclo de las interacciones de actina, miosina y ATP. La activación del ciclo depende de la concentración de Ca^{2+} en la vecindad de la maquinaria contráctil. Si bien la generación de fuerza se explica a través de este ciclo, el incremento de la misma puede ser logrado por dos maneras distintas. Originalmente se propuso un modelo en cual la fuerza generada es proporcional al grado de

superposición logrado entre ambos tipos de filamentos o al número de moléculas que interaccionan entre sí que es controlado por el Ca^{2+} (24).

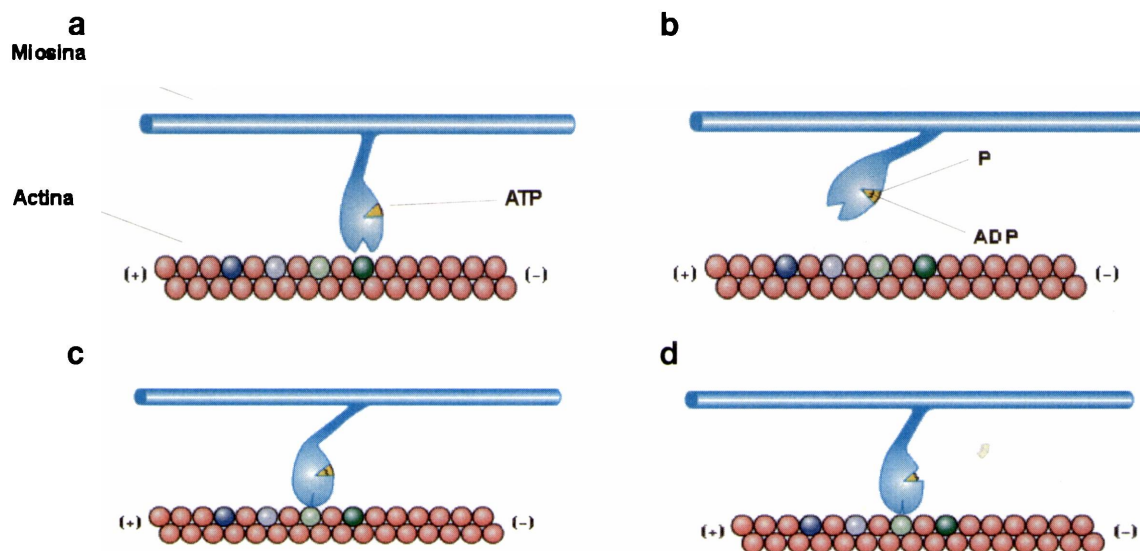


Figura 6.a) Inicialmente la unión de ATP a la miosina inhibe la unión de esta a la actina. **b)** La actividad de la ATPasa de la miosina hidroliza el ATP formando un complejo intermedio miosina ADP-P. Debido a la actividad de ATPasa baja de la miosina, la liberación de ADP y P ocurre muy lentamente. **c)** Luego se produce la unión del complejo miosina ADP-P con la actina para formar el complejo actina-miosina ADP-P. Esta unión de la actina a la miosina es débil sin que se produzca fuerza pero dicha unión activa la ATPasa de la miosina. De este modo se produce la liberación de P_i de alta energía del ATP y produce una unión fuerte de la miosina y actina que conduce a un cambio de la posición del puente transversal (Figura 6,d) produciendo el deslizamiento del filamento fino sobre grueso. Este nuevo complejo actina-miosina se denomina de rigor y a diferencia del complejo actina-miosina-ADP.P tiene contenido de baja energía y permanece estable hasta la llegada de una nueva molécula de ATP que se une a la miosina (24,26).

Por otro lado existen datos que apoyan que la fuerza generada dependería de la velocidad con que se produce el ciclo de contracción-relajación modulado por el Ca^{2+} .

De acuerdo con datos experimentales tanto estructurales (88,93), como bioquímicos (70), a partir de estudios fisiológicos se puede concluir (40):

- 1) La unión del Ca^{2+} a la Tn produce desplazamientos de la Tm que descubre sitios en la A para unirse a la miosina e isomerizar hacia estados de unión fuerte, y producir un nuevo desplazamiento de la Tm que descubre nuevos sitios de unión y en consecuencia más acortamiento.
- 2) Existe una gran cooperatividad en el proceso de activación del filamento delgado muy importante en el músculo cardíaco que puede ser de distintos tipos. En primer lugar puede deberse por la unión de Ca^{2+} a una TnC que facilita que otro Ca^{2+} se pegue a una siguiente TnC (15), lo cual estaría mediado por la Tm ($\text{Ca}^{2+}:\text{Ca}^{2+}$). En segundo lugar el establecimiento de puentes cruzados fuertes dentro de una unidad regulatoria favorece el establecimiento de nuevas uniones fuertes, tanto dentro de esa unidad como en la siguiente (71) (AM:AM). En tercer lugar el establecimiento de puentes cruzados en una unidad regulatoria favorecería la unión del Ca^{2+} a la TnC de la siguiente unidad regulatoria (47) (AM: Ca^{2+}). La unión de la TnI a la TnC permitiría a la TnC fijar Ca^{2+} , favoreciendo la activación (49). La cooperatividad AM: Ca^{2+} mencionada podría facilitar la disociación TnI-A y la unión TnI-TnC. Cualquier condición que favorezca la unión TnI-TnC ayuda a completar el cambio conformacional de la TnC y consecuentemente permitir nuevas uniones AM. Esto hace que la contracción del músculo cardíaco sea muy sensible

a condiciones que influyen la formación de puentes cruzados fuertes como son cambios de la longitud del sarcómero (68), fosforilación de la cadena liviana regulatoria de la miosina o de la proteína C (92) y estimulación o inhibición de la formación de puentes cruzados (79).

Alteración de la respuesta al calcio de los miofilamentos

A nivel celular la contractilidad puede ser regulada de tres maneras distintas que no son mutuamente excluyentes (24) (Figura 7):

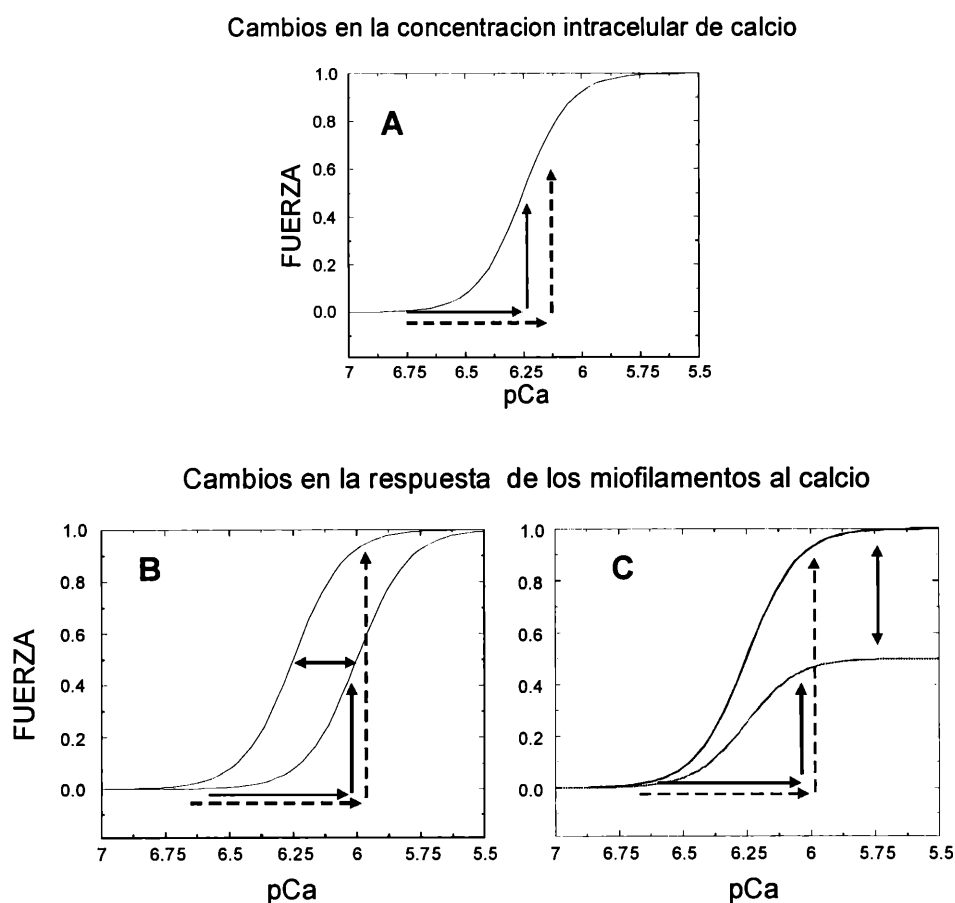


Figura 7, A. Relación fuerza-calcio normal (24). **B.** Cambios en la sensibilidad. **C.** Cambios en la respuesta máxima (24).

a) Por alteración de la $[Ca^{2+}]_i$ (Ver liberación de calcio por calcio), b) por alteración de la sensibilidad al Ca^{2+} de los filamentos delgados sin cambios en la respuesta máxima y c) por la alteración de la fuerza máxima que son capaces de realizar los miofilamentos. Estos dos últimos puntos se conocen como cambios de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. Teniendo en cuenta la relación fuerza-calcio normal (Figura 7,A), el cambio en la sensibilidad, se traduce en un corrimiento de la curva hacia la izquierda o a la derecha (Figura 7,B). Esto significa que para realizar una fuerza dada, se necesitará menor $[Ca^{2+}]_i$ o mayor $[Ca^{2+}]_i$ respectivamente. El mecanismo más sencillo para ilustrar este fenómeno estaría dado por cambios de la afinidad de la TnC por el Ca^{2+} . La alteración de la fuerza máxima, puede estar originada por el cambio del número de puentes cruzados, por el número de puentes cruzados unidos fuertemente a la actina o por cambios en la fuerza desarrollada en forma individual por cada puente. Cualquiera sea el caso, esto es esquematizado en la relación fuerza-calcio de la Figura 7,C. En la práctica resulta difícil distinguir entre cambios de la sensibilidad y la fuerza máxima. Existen distintas situaciones o intervenciones mediante las cuales se puede modificar la respuesta al Ca^{2+} . Un ejemplo de este caso lo constituye el aumento de la sensibilidad y de la fuerza máxima con un aumento de la longitud inicial de la fibra muscular (62). Otras condiciones que cambian la afinidad del Ca^{2+} por la TnC las constituyen cambios en el pH, número de puentes cruzados, fosforilación de TnI, etc. En general teniendo en cuenta que la interacción entre el complejo troponínico, Tm y

actina es muy complejo, cualquier perturbación posterior a la unión del Ca^{2+} a la TnC puede manifestarse en un cambio en la afinidad.

3. ACOPLAMIENTO EXCITO CONTRÁCTIL

a) Introducción

Independientemente de los distintos modelos actuales para explicar la regulación de la contracción, todos ellos coinciden que ésta es iniciada en la medida que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta lo suficiente como para poder unirse a los sitios de unión de calcio de baja afinidad de la TnC. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ correspondiente al músculo en reposo (diástole) es $\sim 10^{-7}\text{M}$ y sube en la contracción (sístole) a un valor máximo de $[\text{Ca}^{2+}]_i \sim 10^{-5}\text{M}$. El proceso fisiológico por el cual una célula muscular es inducida a la contracción se lo conoce como acoplamiento excitación–contracción. Este mecanismo, en el miocardio, es iniciado por la despolarización de la membrana sarcolemal durante un potencial de acción (PA) que permite la entrada del calcio extracelular al interior y activar la liberación de una mayor cantidad de calcio desde el RS. Para que tenga lugar la relajación el calcio debe ser retirado del citosol, para lo cual interviene el RS, y mecanismos localizados en el sarcolema tales como la calcio ATPasa (SERCA) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La posibilidad de cumplir en forma eficiente con esta función se debe al desarrollo especial de ciertas ultraestructuras celulares como la membrana sarcolemal y el RS. Como se describió más

arriba, a través de los túbulos T se conduce el PA que se propaga al interior del miocito. Este proceso despolariza la membrana, permitiendo la entrada de Ca^{2+} , a favor del gradiente desde el espacio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}] \sim 10^{-3} \text{ M}$), a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (lentos) dependientes de voltaje. Esta forma de entrada de Ca^{2+} induce la liberación de Ca^{2+} desde el RS al citoplasma, amplificando el aumento inicial en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ necesario para la contracción. Este fenómeno se conoce como liberación de calcio inducida por calcio (CICR). La liberación de Ca^{2+} del RS se produce a través de los canales de calcio sensibles a Ryanodina (RyR).

b) Canales de calcio voltaje dependiente (VDCC)

Si bien se conocen distintos tipos de canales de calcio operados por voltaje, en músculo cardíaco se encuentran dos tipos, el canal tipo L y el tipo T. Estos canales tienen características estructurales, electrofisiológicas y farmacológicas distintas. Incluso la cantidad relativa de cada uno varía con el tejido estudiado y la especie animal. La corriente de Ca^{2+} a través de los canales tipo L ($I_{\text{Ca,L}}$) es una característica prominente de todos los miocitos cardíacos, mientras que la expresión de la $I_{\text{Ca,T}}$ es mucho más variable, dependiendo del tipo de célula y de la especie animal. En la rata adulta la expresión de $I_{\text{Ca,T}}$ en ventrículo es indetectable (96) y en aurícula corresponde a un valor de 10-20 veces menor que la $I_{\text{Ca,L}}$.

Estructura molecular de los canales de calcio tipo L: Los canales de Ca^{2+} tipo L presentan varias isoformas, así como una variada localización en distintos tipos de tejidos. En el miocardio se lo ha descrito constituido por las subunidades: α_{1C} , α_2 , β_2 , δ . Se conocen cuatro genes que codifican la subunidad α_1 de los canales tipo L que originan los homólogos α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} , α_{1F} . En el corazón se han descrito el RNAm y la proteína para la subunidad α_{1D} , pero ésta se expresa en la aurícula y está ausente en el ventrículo, mientras que el RNAm y la proteína para α_{1C} se expresa en ambos tejidos (85) y es la que es generalmente aceptada como constituyente de los canales L.

La **subunidad** α_{1C} es un péptido de PM ~170-195kd (19,27,29,34,59). Los estudios de clonación (73) permitieron obtener el PM a partir de su estructura primaria lo que dió un valor de 242.771 d. Se encontraron varias isoformas de la subunidad α_{1C} , producidas por "splicing" alternativo del RNAm en al menos nueve regiones distintas. La subunidad α_{1C} es la subunidad mayor y tiene las principales características que permiten caracterizar al canal tipo L por poseer:

- El poro conductor de los iones. Su estructura permite incluirlo en la superfamilia de canales voltaje dependientes que se caracterizan por poseer una unidad fundamental que se repite cuatro veces (I, II, III, IV) que incluye, cada una, seis regiones de transmembrana S1, S2, S3, S4, S5 y S6 y un "loop" P que se corresponde con el poro.

- El sensor de voltaje. La secuencia de aa del segmento S4 (48) posee una elevada conservación y similitud con la de otros canales más estudiados, como los de potasio. Este segmento se caracteriza por estar enriquecido en cargas positivas (una cada tres residuos). El S4 respondería al cambio de potencial de membrana, con un ligero corrimiento intramembranoso de las cargas positivas que induce un cambio conformacional de la proteína (18).
- La selectividad para el Ca^{2+} . Esta proviene del "loop" P de cada una de las cuatro unidades que se repiten. Se caracteriza por estar enriquecido en ácido glutámico lo que provee cargas negativas que permiten unir el Ca^{2+} (30)
- El sitio de fijación del Ca^{2+} que induce la inactivación del canal. Este no está precisamente definido, pero estaría formado por múltiples partes, estando ubicada la mayoría en el extremo carboxilo citoplasmático terminal luego del segmento IVS6 (4,98).
- Los sitios de unión a distintas drogas como Fenilalquilaminas, Dihidropiridinas (DHP), Benzotiazepinas.
- Posee los sitios de fosforilación por PKA, PKC y glicosilación.

La subunidad α_2 es una proteína muy conservada de ~140-155 kd (50) que se encuentra ubicada en el lado extracelular de la membrana. Esta unida a través de un puente disulfuro a **la subunidad δ** de PM~32-29 kd (27) que está anclada a la MS por un segmento hidrofóbico. Se ha demostrado que en músculo esquelético estas dos subunidades son codificadas por un mismo gen α_2 , con lo cual δ constituye un producto

proteolítico (28,54). Los RNAm transcritos de $\alpha_2\delta$ presentan "splicing" alternativo, tejido específico, que origina tres isoformas α_{2a} (m. esquelético), α_{2b} (cerebro), α_{2c} , α_{2d} , siendo α_{2c} y α_{2d} las más abundantes en corazón. Las subunidades $\alpha_2\delta$ participan en la formación de un canal funcional ya que la coexpresión con α_{1C} duplica los sitios de unión de DHP, su afinidad y las corrientes iónicas.

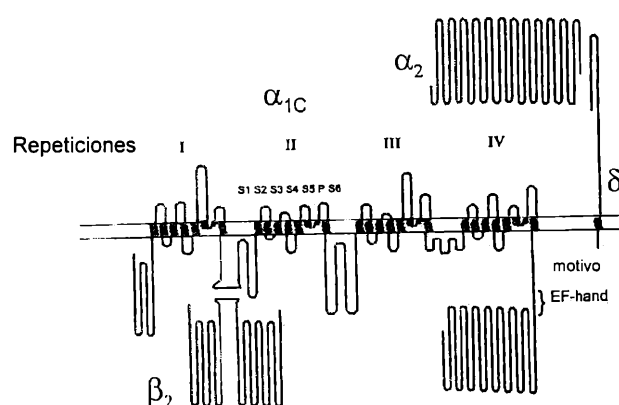


Figura 8. Canal tipo L

La **subunidad** β también presenta "splicing" alternativo. Se encuentra β_{2a} en cerebro y β_1 , β_2 , β_3 en corazón (25), aunque la más abundante en corazón es la β_2 . Esta subunidad interactúa con α_{1C} a través del "loop" entre las repeticiones I y II. Esta subunidad participa en el armado del complejo posiblemente al modo de chaperonas (11) y regulando la actividad del canal por proteína kinasas (46).

Propiedades de los canales de calcio tipo L (69): Los canales de calcio tipo L se activan por cambios en el voltaje de la MS (voltaje

operado) y comienzan a abrirse a potenciales de membrana (E_m) de ~ -40 mV. Fisiológicamente la entrada de Ca^{2+} por los canales tipo L se produce durante el PA, donde el E_m varía desde el reposo (~ -80 mV) hasta un pico en la despolarización de ~ 35 mV. A medida que el potencial de membrana va aumentando, también lo hace la probabilidad de apertura del canal, siendo esta dependencia del tipo sigmoidea y no lineal (ohmica). Por éste motivo estos canales son voltaje dependientes (VDCC), además de ser voltaje operados. Por otro lado, si bien a mayor E_m hay más canales abiertos, a medida que aumenta E_m , la fuerza directriz ($E_m - E_{rev}$) para la entrada de Ca^{2+} se va reduciendo, con lo cual tiende a reducirse la corriente $I_{Ca,L}$.

Luego de la activación, el canal se inactiva y deja de estar funcionalmente disponible para llevar $I_{Ca,L}$, siendo éste también, un proceso voltaje dependiente y tiempo dependiente. Es decir que la inactivación disminuye en forma sigmoidea con el aumento del voltaje (E_m) y aumenta con el tiempo que se mantiene la despolarización de la MS. Para esta última situación, las constantes de tiempo de inactivación también varían con el voltaje. La inactivación del VDCC es dependiente del Ca^{2+} , es decir que las I_{Ca} más grandes se inactivan más rápido. Este fenómeno depende de la $[Ca^{2+}]_i$ y por lo tanto también depende del RS. En un acoplamiento E-C normal la salida de Ca^{2+} del RS permite reducir hasta en un 50% el influjo integrado de Ca^{2+} vía $I_{Ca,L}$ (78). Los canales tipo L (lentos) se inactivan más lentamente y a potenciales más positivos que los canales de tipo T (rápidos). El canal se reactiva cuando se repolariza

la membrana, y pasa del estado inactivo (no disponible) a un estado cerrado (disponible).

c) Receptor de Ryanodina (RyR)

El **RyR** es una proteína que se encuentra en la membrana del RS, particularmente en la región adyacente al tubo T, conocida como RS de unión. Constituye el canal que permite la salida de Ca^{2+} desde el RS durante el acoplamiento EC.

Estructura molecular (37): Este canal presenta tres isoformas RyR1, RyR2, RyR3, con una homología de ~70%. Las tres isoformas se encuentran en el miocardio pero la RyR2 es la más abundante y característica del mismo. Este canal está constituido por cuatro subunidades de ~560 kd cada una estrechamente asociadas entre sí asemejando en la estructura global a un trébol de cuatro hojas. Si bien la estructura tridimensional de la proteína no está completamente dilucidada, se han identificados ciertas estructuras de las mismas. La región carboxilo terminal permite anclar la proteína a la membrana, mientras que el resto mucho mayor de la proteína se proyecta ~14 nm hacia el lado citoplasmático. El dominio de transmembrana es de ~7 nm de alto y permite la formación del canal por donde atraviesa el Ca^{2+} . El dominio citoplasmático del RyR es también conocido como "pie" y en virtud de su tamaño le permite alcanzar a la membrana del sarcolema y estar casi pegada a los VDCC tipo L.

Existen otras proteínas intraluminales que están físicamente asociadas al RyR, tales como la *juntina*, *triadina*, *calsecuestrina*, *FKBP*, que modulan la actividad del canal (37).

La *FKBP12* es una proteína de ~12 kd, fuertemente unida al RyR en una relación 1:1 con cada subunidad que permitiría el acoplamiento entre las subunidades del tetrámero y entre tetrámeros, así como favorecer y estabilizar estados extremos del RyR, ya sea totalmente abierto o totalmente cerrado. También se ha descrito que favorece la corriente de Ca^{2+} desde el lumen del SR al citosol y la bloquea en el sentido contrario. La *Calsecuestrina* es una proteína luminal cargada negativamente, que posee una gran capacidad de fijar calcio, localizada en el RS de unión. La *Juntina* es una proteína de ~26 kd cuya región de transmembrana es estructuralmente similar al mismo sector de la *Triadina* una proteína de ~95kd que tiende a formar grandes multímeros a través de puentes disulfuro intraluminales. Estas dos proteínas se co-localizan en el RS de unión e interaccionan entre sí, con RyR2 y con la calsecuestrina. Un modelo aun especulativo sugiere que estas dos proteínas serían necesarias para acoplar la calsecuestrina al RyR en un complejo de unión sensible al calcio, que facilitaría la descarga de calcio de la calsecuestrina en la medida que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ se reduce, durante la liberación al citosol.

El Ca^{2+} es el activador fisiológico normal y activa al RyR2 en un rango de concentración de 1-100 μM que es relevante durante el acoplamiento E-C, en un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} . Si bien el Mg y el ATP condicionan la repuesta del RyR

no lo hacen durante el acoplamiento E-C, dado que no varía en forma tan rápida. La sensibilidad del RyR para la liberación de Ca^{2+} parece ser mayor para cambios rápidos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comparados con cambios lentos próximos a un estado estacionario de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (32,45).

d) Liberación de calcio inducida por calcio

Durante el acoplamiento EC se produce un aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ("transient" de calcio). El "transient" de calcio se produce principalmente porque el Ca^{2+} que entra a la célula, a favor del gradiente desde el espacio extracelular por los VDCC tipo L y activa la liberación de Ca^{2+} del RS, a través de los RyR2 (31). Esta activación es conocida como *liberación de calcio inducida por calcio* y se ve favorecida por la ubicación relativa de los canales VDCC tipo L y los RyR2. Espacialmente estos canales se encuentran muy cercanos entre sí (11) y estequiométricamente se encuentran entre cuatro y diez RyR por cada VDCC tipo L. (12). La cercanía entre sí de las moléculas de RyR permitiría que la salida de calcio por uno de ellos active al canal RyR vecino (83,10). La contribución relativa al total de calcio del "transient" necesario para la activación del proceso contráctil, varía según las distintas especies. En el caso de la rata la contribución de los VDCC tipo L es pequeña, siendo el principal aporte de calcio, el proveniente del RS. Es decir que se produce una amplificación de la señal de calcio producida por su entrada desde el espacio extracelular.

Recientemente se ha descrito la liberación localizada y espontánea de Ca^{2+} el RS que se denominó “sparks” (21). Estos “sparks” parecieran ser producto de la liberación de calcio desde un grupo de RyR que funciona como una unidad funcional. También se ha demostrado que los “sparks” pueden ser evocados por Ca^{2+} que entra por la $I_{\text{Ca,L}}$ (17). Por este motivo probablemente el “transient” de Ca se deba la activación simultánea e indistinguible entre sí, de un gran número de “sparks” (16).

Actualmente se han propuesto otras vías de entrada de Ca^{2+} que pueden inducir la liberación de Ca^{2+} del RS, pero que no son fisiológicamente tan importantes como la recientemente descrita. Estas serían:

-Entrada de Ca a través de VDCC tipo T (97).

-Entrada de Ca a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este es un mecanismo electrogénico que intercambia 1 Ca^{2+} por 3 Na^+ . La dirección en la cual se realiza el intercambio depende fundamentalmente del gradiente electroquímico para el Ca^{2+} y Na^+ . Normalmente cuando la célula se encuentra o vuelve al reposo luego del PA ($E_m < E_{\text{rev}} - 30\text{mV}$) está activo el modo “forward” que permite la entrada del Na^+ . La entrada de calcio puede ocurrir cuando se activa el modo “reverse”, lo cual ocurre por un período de tiempo muy corto durante el PA cuando la membrana se despolariza por encima de -30mV . También, como lo describieron Leblanc y Hume (61) el aumento local de $[\text{Na}^+]_i$ en el espacio subsarcolemal cuando éste entra por los canales de Na puede inducir a trabajar al intercambiador en el modo inverso ingresando Ca^{2+} . La inducción de la

liberación de Ca^{2+} del RS por este mecanismo sería mínimo comparado con el del VDCC tipo L porque el flujo Ca^{2+} a través de este intercambiador es ~ 1000 veces menor y geoméricamente ni su cercanía al RyR ni su distribución en la membrana es similar.

-Entrada de Ca a través de canales de sodio. Este mecanismo se describió en condiciones donde se podría alterar la selectividad del canal al sodio para permitir el pasaje de Ca^{2+} (5,80).

-Existen numerosos factores que se han descrito que pueden modular la liberación de Ca^{2+} desde el RS, tales como la amplitud de $I_{\text{Ca,L}}$, la cantidad de calcio dentro del RS, Mg, proteínas como CaMKII, PKA, etc.

La magnitud del “transient” de calcio depende entonces, básicamente de dos factores que son $I_{\text{Ca,L}}$ y de la cantidad de Ca^{2+} dentro del RS (81,86). Teniendo en cuenta el origen del “transient” de Ca^{2+} , dentro de ciertos límites un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ determina un aumento de $I_{\text{Ca,L}}$ que a su vez produce un aumento del “transient”. A consecuencia de un mayor aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante el “transient” se produce un aumento de la contractilidad del miocardio según muestra la Figura 7,A.

d) Relajación del miocardio

El descenso de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde los niveles alcanzados en la contracción determina la relajación. El RS es el principal responsable de la relajación muscular. El transporte del calcio al interior del RS es realizado en contra de un gradiente, a expensas del consumo de ATP, por

la Ca^{2+} ATPasa (SERCA). En músculo cardíaco se expresa principalmente la isoforma SERCA2a. Se transportan 2 moles de Ca^{2+} por cada mol de ATP. En el interior del RS el calcio está concentrado unas 1000 veces más que en el citosol. El RS puede regular su capacidad de retomar Ca^{2+} a través de la SERCA por medio de la fosforilación de una proteína conocida como fosfolamban. En su estado desfosforilado la fosfolamban inhibe a la SERCA. La fosforilación de la fosfolamban libera esta inhibición, lo cual activa la SERCA. La fosforilación de esta proteína es llevada a cabo por dos quinasas diferentes, la PKA y la Ca-Calmodulina quinasa. La actividad de la SERCA es muy sensible a los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ citosólico principalmente por su rol como sustrato. El calcio tendría un segundo papel estimulando la Ca-Calmodulina quinasa. También depende de los niveles [ATP] por su función como proveedor de energía.

Un segundo mecanismo que contribuye a la relajación de la célula lo constituye el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Durante la declinación del PA cuando $E_m < E_{rev} - 30\text{mV}$ se activa el modo que permite la entrada de sodio y salida de calcio. Este mecanismo alcanza para eliminar la cantidad extra de calcio que entra por la $I_{\text{Ca,L}}$ dentro de los rangos fisiológicos de $[\text{Ca}^{2+}]_o$ (86).

4.BLOQUEANTES DE LOS CANALES DE CALCIO

La contractilidad celular, estudiada tanto en el corazón entero como en células aisladas, puede ser modulada farmacológicamente teniendo en

cuenta los numerosos pasos que intervienen antes que se produzca el proceso final de contracción.

a) Dihidropiridinas

A partir de los estudios farmacocinéticos con nifedipina de Vater *et al*, 1972 (87) y de Flekenstein *et al* (35) en adelante, se conoció que la entrada de Ca^{2+} por los canales tipo L es bloqueada por un grupo de compuestos sintéticos de bajo peso molecular caracterizadas químicamente como dihidropiridinas (DHP). Estas conforman junto con las fenilalquilaminas (Ej:Verapamil) y benzotiazepinas (Ej:Diltiazem) un grupo clásico de drogas que actúan sobre los VDCC tipo L conocidos como antagonistas cálcicos. Los distintos compuestos que pertenecen a estas tres clases de drogas se unen con gran afinidad al canal tipo L y particularmente reconocen distintos sitios en la subunidad α_1 , que pueden interaccionar entre sí de manera alostérica. También se ha descrito que ciertas DHP se unen en músculo cardíaco a otros sitios con menor afinidad como los canales de sodio (95,96) y potasio (41). La nifedipina, que es un compuesto que pertenece al grupo de las DHP así como otros compuestos de su clase, en su mayoría no reaccionan con los VDCC tipo T. Las DHP son, de las tres clases de bloqueantes, los que se unen con mayor afinidad a los VDCC tipo L, motivo por el cual generalmente a estos canales se los denomina también como receptores de DHP. Estas características mencionadas de las DHP permitieron que fueran usadas para caracterizar, aislar y purificar los VDCC tipo L.

b) Bases estructurales de la unión de DHPs a los VDCC tipo L

Los estudios de baja resolución como los de marcación de fotoafinidad y mapeo con anticuerpos sugieren que los sitios de pegado de gran afinidad están ubicados en los segmentos de transmembrana S6 de la repetición III y IV (IIIS6 y IVS6) y en el loop que une IIIS5-6 (Figura 9). Con la generación de canales quiméricos se confirmaron los resultados anteriores y se agregó un nuevo sitio que corresponde al segmento IIIS5, señalando que no tendrían tanta importancia el "loop" S5-S6. Estudios de mutagénesis dirigida confirmaron como muy importantes 13 aa ubicados en IIIS5, IIIS6 y IV6 exclusivos de los canales tipo L.

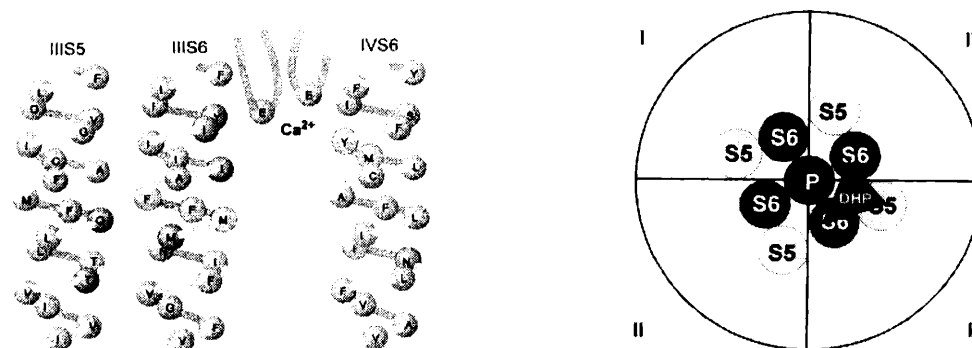


Figura 9. A. aa que participan en la unión a DHP **B.** Posible esquema de las hélices de transmembrana que unen a la DHP (84).

La unión de las DHP al VDCC tipo L requiere de ciertas condiciones:

- Necesita la presencia de iones divalentes como el Ca²⁺, Mg²⁺. Para que las DHPs se puedan unir con gran afinidad es necesario que el Ca²⁺ esté

unido al canal. El sitio donde se encuentra el Ca^{2+} corresponde a aquel que le da selectividad, conformado por los glutamatos del "loop" S5-S6 de las cuatro repeticiones

- Depende del estado de actividad del canal. Las DHPs se unen preferentemente en el estado abierto o inactivo, mientras que lo hacen con poca afinidad si éste está en el estado cerrado. El estado abierto o inactivo del canal son estados que se encuentran en el PA, por lo cual la unión de las DHPs al canal se dice que es uso dependiente. También el estado abierto se encuentra cuando se produce la extracción experimental de membranas cardíacas (39).

En conjunto estos resultados muestran que las DHPs se unen a un sitio cercano al del sitio de fijación de Ca^{2+} y a su vez cercano al poro del canal (84).

c) Aspectos bioquímicos del tratamiento crónico con DHP

En un gran número de sistemas se ha demostrado que la ocupación por un tiempo prolongado de los sitios receptores lleva a una alteración del número de los mismos. Por ejemplo, la ocupación crónica de los receptores β -adrenérgicos con agonistas lleva a la reducción en el número de los mismos (2,58,66). Inversamente, el tratamiento crónico con propanolol, un bloqueante de los receptores β , induce un aumento en el número de los mismos (1,3). Los resultados obtenidos luego del tratamiento crónico con nifedipina sobre el número de receptores de DHP, son objeto de controversia. Se han informado resultados en los que éstos

no se modifican (76), disminuyen (38) o aumentan (20,22,23). Si los canales que varían son funcionales, entonces debiera de corresponderse con variaciones en la corriente de Ca^{2+} . Estudios de Le Grand (60) y otros en miocitos aislados de aurícula de humano encontraron que el tratamiento crónico con antagonistas cálcicos genera una disminución de la $I_{Ca,L}$. En un trabajo más reciente, Mewes y Ravens (72) trabajando con la misma técnica y utilizando una preparación similar, encontraron idéntica densidad de $I_{Ca,L}$ en miocitos auriculares de pacientes tratados con y sin antagonistas cálcicos, contradiciendo los resultados de Le Grand y col (60).

OBJETIVOS

De acuerdo con los resultados de la bibliografía, los efectos obtenidos sobre la función cardíaca y sobre las características del canal L de Ca^{2+} luego del tratamiento crónico con nifedipina son variados y contradictorios (43,56,99,100). Teniendo en cuenta que los canales L de Ca^{2+} constituyen la primera etapa en la génesis de la contracción, en este estudio se evaluó el efecto del tratamiento crónico con nifedipina sobre las características y funcionalidad de los canales L de Ca^{2+} en el corazón de rata. Con este propósito se analizó:

- La densidad de los sitios receptores de dihidropiridinas en membranas cardíacas.
- El "transient" de Ca^{2+} y el acortamiento celular en miocitos aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Los experimentos correspondientes a este trabajo este trabajo se llevaron a cabo utilizando ratas macho de aproximadamente 5 meses de edad provenientes de la cepa Wistar normotensas, cuyo peso osciló entre 250-300 gr. Los animales fueron criados bajo idénticas condiciones de luz y temperatura y tuvieron libre acceso al agua y alimento. Los animales apareados por peso y edad y se dividieron en dos grupos: no tratados (controles) y tratados con nifedipina. Los animales tratados recibieron durante 30 días una dosis oral de nifedipina (Adalat Retard, Bayer) de 10mg/Kg/dia. Para la administración se pulverizó la gragea (20 mg) y se la suspendió en 800 μ l de agua común de los cuales se les obligó a beber 100 μ l diariamente.

Antes y después del tratamiento con nifedipina se determinó la presión arterial sistólica (PA) mediante el método pletismográfico (14) en la arteria de la cola. Para aumentar el flujo sanguíneo en la arteria se colocó a los animales en una incubadora a 40 °C durante 20 minutos. Se rodeó la cola con un manguito inflable conectado a un manómetro de mercurio y distalmente se colocó un transductor neumático de pulso conectado a un osciloscopio. Para medir la PA se insufló rápidamente el manguito hasta interrumpir la circulación y luego se desinfló lentamente (~2mmHg/seg) hasta ver la onda de pulso en la pantalla del osciloscopio.

El valor de presión registrado por el manómetro en el cual aparecía el primer registro de pulso se consideró la presión arterial sistólica.

Extracción del corazón

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico 8mg/100g de peso por *vía* intraperitoneal y una vez inconscientes se procedió a extraer el corazón. Se corta la piel para dejar al descubierto la parrilla costal. Ésta se cortó desde el esternón para poder replegarla hacia arriba, sujetándola con una pinza Cocher, de modo que la zona ocupada por el corazón quedó al descubierto. Al corazón se le inyectó 1 ml de heparina en la aurícula para evitar la formación de coágulos durante la extracción que impidan una adecuada perfusión del mismo. Inmediatamente se hizo un corte en la arteria aorta aproximadamente 3 mm por encima de su nacimiento en el corazón. Seguidamente se introdujo una cánula a través del corte que se sujetó a la arteria con un hilo que rodeó la sección de la arteria canulada. Luego se separó el corazón cortando los vasos y membranas que lo fijan al cuerpo del animal y fueron montados en un aparato de Langendorff. Este proceso de extracción se realizó muy rápidamente, para evitar la isquemia del corazón.

Aislamiento de miocitos

El comportamiento mecánico y el “transient” de calcio se determinaron en miocitos aislados de corazón de rata. Los corazones fueron extraídos a partir de ratas Wistar controles y tratadas con nifedipina como se indicó anteriormente.

Una vez extraído el corazón fue perfundido en forma retrógrada a 37 °C a una presión de perfusión constante de 70-80 mm Hg con solución Krebs-Henseleit (K-H) de la siguiente composición en (mM): NaCl 146,2; KCl 4,69; CaCl₂ 1; Glucosa 11; NaH₂PO₄.H₂O 0,35; ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES) 10; MgCl₂ 1,05 a pH=7,4 y burbujeada con una mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5% durante 4 min. Durante esta etapa de estabilización el corazón siguió latiendo espontáneamente. Seguidamente fue perfundido con la misma solución K-H libre de calcio durante 6 min. Este procedimiento es muy importante para obtener un buen rendimiento de miocitos ya que cuando se intenta aislar los miocitos en presencia de calcio se observa que éstos se contracturan y mueren (38). Para facilitar la separación de los miocitos, es necesario exponer brevemente el corazón a un medio libre de calcio, dado que la presencia del mismo estaría involucrada en el mantenimiento de la integridad de los desmosomas de los discos intercalares. Esta maniobra está condicionada en el tiempo dado que simultáneamente se produce una separación del glucocalix de la membrana, lo cual origina

miocitos hiperpermeables al calcio cuando se lo reexpone a concentraciones fisiológicas del ion (38). El tiempo de perfusión con la solución virtualmente libre de calcio requiere un control muy preciso para evitar tanto la pérdida del glucocálix como la pérdida excesiva de Ca^{2+} . Estos dos factores pueden ser causa de una excesiva entrada posterior de Ca^{2+} a la célula, contractura y muerte. La digestión del corazón se lleva a cabo durante 12 min al mismo flujo, con la misma solución K-H pero en presencia de CaCl_2 50 μM , colagenasa 0,6 mg/ml (118 unidades/ml, Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ), pronasa 0,114 mg/ml (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) y seroalbúmina bovina (BSA) 1% libre de ácidos grasos (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA). La presencia de cationes bivalentes como CaCl_2 50 μM disminuye la separación del glucocálix y a la vez previene la muerte celular durante la posterior reperfusión con CaCl_2 1 mM. La concentración de CaCl_2 durante la reperfusión debe estar cuidadosamente controlada y evitar que sea superior a 50 μM porque podría producirse influjo de calcio con la consiguiente muerte celular.

Una vez que el corazón está digerido se lo retiró del aparato de perfusión y fue colocado en una cápsula de Petri donde gradualmente se lo expuso a calcio comenzando con solución K-H CaCl_2 0,5 mM y BSA al 1%. Luego se cortó transversalmente por la unión aurículo-ventricular y se descartaron las aurículas. Los ventrículos en un volumen de aproximadamente 6 ml fueron cortados con tijera en pequeños trozos, se

agitó suavemente para favorecer la disgregación de los miocitos y su liberación del tejido no digerido. En esta etapa se rompen las uniones "gap junction" que representan aproximadamente 10-13% del área de los discos intercalares. En miocitos sanos la ruptura y resellado es rápido y se evita el movimiento importante de iones según sus gradientes de concentración, como podría ser la entrada de Ca^{2+} a la célula, produciendo la muerte celular. Finalmente se procedió a la filtración a través de una malla de nylon de aproximadamente 300 μm para separarlos del resto del material no digerido y resuspensión en 15 ml de solución K-H, en un tubo de ensayo. Se los dejó sedimentar, se descartó el sobrenadante que contiene en su mayoría células muertas y restos celulares sin interés. Este procedimiento se realizó dos veces más, y finalmente fueron resuspendidos en una solución K-H con CaCl_2 1 mM (9).

Preparación de membranas cardíacas.

El ensayo para determinar la densidad de canales de calcio se realizó en membranas aisladas del ventrículo del corazón de rata.

Una vez extraído el corazón fue perfundido a través de la aorta en forma retrógrada por el método de Langerdoff con solución Ringer en mM: NaCl 128,3; KCl 4,69; CaCl_2 1,35; Glucosa 11; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,35; CO_3HNa 20,2; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,05; pH=7,4, burbujeada con una mezcla de

O₂ 95% y CO₂ 5% a 37 °C. Una vez lavado el corazón se disecaron los ventrículos, cortando por la unión aurículo-ventricular. Posteriormente se los sumergió en solución Ringer a 4 °C hasta el momento de ser pesado, para lo cual se le quitó el exceso de humedad escurriéndolo muy suavemente sobre papel. Las fracciones de membrana se prepararon de acuerdo al método ya descrito por nuestro laboratorio (23). El tejido se cortó con tijeras en pequeños trozos y luego se homogeneizó con 4 volúmenes (peso/volumen) de Trihidroxiaminometano-HCl (Tris-HCl) 50 mM, pH=7.4, con homogeneizador Brinkmann Polytron (2 veces, 20 seg en posición 6). El homogenato se centrifugó 10 min a 1000 x g. El sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 48000 x g durante 25 min. El sedimento resultante fue resuspendido en el volumen original de Tris-HCl 50 mM y se lo homogeneizó manualmente con un homogeneizador de teflón-vidrio. La suspensión se lavó de esta manera 2 veces centrifugando cada vez 48000 x g durante 25 min. Todo el procedimiento se realiza a 4°C. Finalmente el sedimento fue resuspendido en el buffer de homogeneización y se determinó la concentración de proteínas.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (13), que consiste en una reacción colorimétrica en la cual las

proteínas interaccionan con el colorante Coomassie Brilliant Blue. Esta reacción se midió con el espectrofotómetro Spectronic 21 (Bausch & Lomb). La concentración de proteínas de una muestra se obtiene en referencia a una curva de calibración (densidad óptica vs [proteína]). Esta curva de calibración se realiza a partir de una muestra estándar de BSA de 1mg/ml, con concentraciones de 5µg, 10µg, 15µg y 20µg. Las muestras (10µl y 20µl) se obtuvieron de una dilución 1/10 de la suspensión de membranas anterior. La interpolación de los valores de densidad óptica (DO) en la curva de calibración permite conocer la concentración de cada muestra.

Radioensayo de “binding”

La densidad de los canales de calcio se midió de acuerdo a la unión específica ("binding") al receptor de dihidropiridinas con el radioligando [metil ³H]PN 200-110 (New England Nuclear). Aproximadamente 200 µg de proteína se incubaron durante 1 h a 25°C en 0.5 ml de Tris- HCl 50 mM con concentraciones crecientes de [metil ³H]PN 200-110 de 0.025nM, 0.05nM, 0.1nM, 0.2nM, 0.4 nM, 0.8nM, 1nM, 2nM, 3nM, 4nM. Para obtener la unión al receptor no específica se incubó paralelamente en presencia de nifedipina 2.5 µM. La reacción se finalizó agregando 4 ml de Tris-HCl 50 mM a pH 7.4 y se filtró a través de filtros Whatman GF/B humedecidos con el mismo buffer. Los filtros fueron

lavados 5 veces con el mismo buffer a 0°C, se secaron y se midió la radiactividad en contador de centelleo líquido. La unión específica de [Metil-³H]PN 200-110 al receptor se define como la diferencia entre la unión total y la cantidad unida en presencia de 2.5 μM de nifedipina. La constante de disociación K_d y la unión específica de [Metil-³H]PN 200-110 (β_{max}) se obtienen por el método de Scatchard para cada experimento realizado por duplicado.

Medida de los “transients” de calcio y del acortamiento celular

Los miocitos son cargados durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente con el indicador de calcio fluorescente Indo 1-AM (Molecular Probes) 17 μM en su forma de éster (eléctricamente neutra) para permitir la entrada a la célula a través de la membrana. Se centrifugó a baja velocidad, se eliminó el sobrenadante y se los dejó 45 minutos en la oscuridad para permitir la desesterificación del Indo 1-AM, lo cual permite dejar libres los grupos carboxilo del indicador y unirse al calcio. Seguidamente se colocó 0.5 ml de la suspensión de células en una cámara de vidrio sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para epifluorescencia y se las dejó fijar al fondo 10 min. Luego los miocitos fueron perfundidos continuamente con solución K-H ($[Ca^{2+}]$ 1 mM a pH=7,4) a flujo constante (1ml/min). Las células fueron excitadas por un campo eléctrico de 2 mseg de duración

con una frecuencia de 30 pulsos/min, a través de electrodos de platino colocados a lo largo de las paredes de la cámara. La imagen de las células individuales iluminadas con luz roja (610nm), se proyectó en un monitor de alta resolución (Sony) a través de una video cámara (Pulnix TM 640), y los cambios en la longitud de la célula fueron evaluados a través de un detector de movimiento de bordes (Crescent Electronics VED-103) ubicados en los extremos del miocito. La señal se transmitió a un registrador (Gould RS 3200) y a una computadora en donde se almacenó para su posterior procesamiento. La distancia que separa los detectores de bordes fue medida por medio de un ocular que tiene grabado una regla, que permite asignar a esa distancia un valor conocido de longitud. Conociendo el acortamiento del miocito en la pantalla se calibra el registrador de manera que se correspondan los micrones del acortamiento con un trazo de una longitud determinada sobre el papel de registro. La longitud inicial del miocito en reposo se la tomó como L_0 . Los cambios de la longitud del mismo fueron calculados como porcentajes de L_0 . Las células cargadas con Indo1-AM fueron excitadas por epi-iluminación con una lámpara de Xenón a través de un filtro de 350 ± 5 nm, transmitida al miocito a través de un espejo dicroico (refleja longitudes de onda <380 nm), colocado debajo del microscopio. La señal de emisión se recolectó con el objetivo del microscopio (x40) y se transmitió a través de filtros de 410 y 482 nm, a dos fotomultiplicadores (PMT) (R2693, Hamamatsu). El esquema de este equipo se muestra en la

Figura 10. La salida de los fotomultiplicadores se recogió (a través de un convertidor I/V) y almacenó en una computadora para su posterior análisis. La relación o cociente de la señal 410nm/482nm se la puede considerar una medida de calcio intracelular (8). Antes de obtener la relación de fluorescencia a 410/482 nm se restó previamente la señal de fondo. El cociente de fluorescencia diastólico se obtuvo haciendo el promedio de los puntos correspondientes a los últimos 100 msec de duración del pulso de despolarización. El sistólico se consideró directamente el punto más alto del "transient".

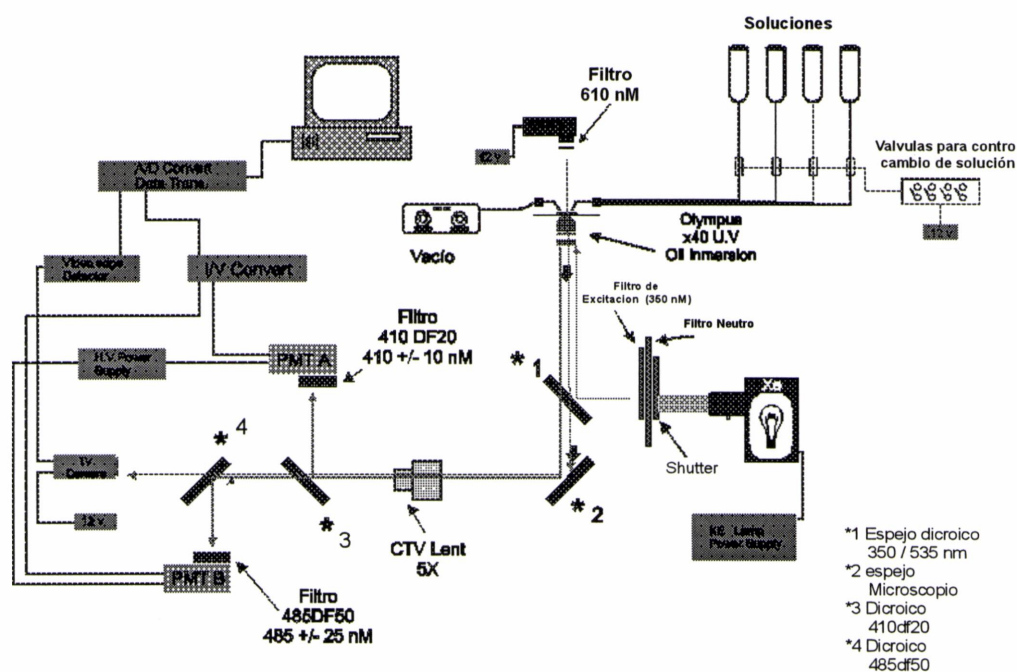


Figura 10. "Set-up" para medir fluorescencia y acortamiento

Cuando los miocitos aislados son cargados con Indo 1-AM hay una compartimentalización del indicador en las mitocondrias, cuyo grado

varía de célula a célula. Esto hace que la calibración de la fluorescencia sea cuestión de controversia (8) y en consecuencia en muchos casos los resultados se expresen simplemente como relación de fluorescencia. A pesar de conocer esta dificultad se siguió un protocolo de calibración que han seguido otros autores. Las conclusiones de los experimentos fueron las mismas de todas maneras cuando la señal de Indo-1 se expresó como relación de fluorescencia o con la estimación realizada. La $[Ca^{2+}]_i$ se la estimó a partir de la ecuación de Grynkiewicz et al (1985) (42):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \beta [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)]$$

Los valores de R_{min} y R_{max} corresponden a los valores del cociente de fluorescencia sin Ca^{2+} y EGTA (R_{min}), y a una concentración de Ca^{2+} a saturación (R_{max}), y β es la relación de las señales de fluorescencia del Indo-1 a 482 nm sin Ca^{2+} y Ca^{2+} a saturación. Luego que las células fueron cargadas con Indo-1AM fueron perfundidas con solución K-H sin Ca^{2+} durante 15 min. La solución de perfusión se cambió a otra de alto potasio (en mM): 10 NaCl; 130 KCl; 1MgCl; 5 HEPES; 5 EGTA. Luego de 20 minutos de perfusión, para limitar la hipercontractura posterior al agregado de Ca^{2+} , se agregaron para inhibir el metabolismo 3 μ M carbonyl cianida *p*(trifluoromethoxy) phenylhidrazona (FCCP, Sigma Co.) y 10 mM 2-deoxiglucosa. El R_{min} se lo obtuvo agregando a la solución 50 μ M de Ionomicina (Calbiochem) o 10nM 4-Br-A23187 (Calbiochem). La señal fue seguida hasta que el cociente alcanzó un estado estacionario. Esto ocurrió generalmente luego de 60 minutos de perfusión en las

condiciones descritas. Para la determinación del R_{max} se perfundió con solución K-H libre de EGTA y con Ca^{2+} 10 mM. También se agregó a la solución Ionomicina 50 μ M (Calbiochem) y 4-Br-A23187 (Calbiochem) 10nM. Los valores promedios hallados para R_{min} , R_{max} y β fueron 0.259 ± 0.022 , 1.02 ± 0.07 y 3.5 ± 0.7 respectivamente. Para calcular la concentración de Ca^{2+} con Indo 1 se usó una constante de disociación aparente (K_d) de 844 nM determinada *in vivo* por Bassani et al (9). Este valor aparente de K_d es más apropiado que el calculado *in vitro* dado que fue determinado en el entorno celular nativo que es más aproximado a las condiciones usadas en los experimentos presentes.

Todos los resultados se expresaron como la media \pm error estandar (ES). El análisis estadístico se realizó con el test de "Student", considerándose estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$. Se usó el análisis de covarianza para comparar la relación acortamiento vs "transient" en ratas tratadas vs controles.

Todas los reactivos utilizados fueron pro-análisis.

RESULTADOS

Se estudió el efecto del tratamiento crónico con nifedipina sobre los canales de calcio tipo L, receptores de dihidropiridinas (DHP), en el corazón de rata. Para ello se midieron la cantidad de receptores de DHP en membranas cardíacas y las propiedades funcionales de los canales de calcio tipo L, a través de la medida del aumento transitorio de calcio ("transient") y acortamiento mecánico en miocitos aislados.

A) Características Generales de los Animales

El tratamiento crónico de ratas Wistar con 10 mg/Kg/día de nifedipina durante 28 días no produjo cambios significativos en el peso corporal, peso del corazón y presión arterial. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos, controles y tratados con nifedipina, respecto al tamaño de los miocitos. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

	Control (n=14)	Nifedipina (n=11)
Peso Corporal (g)	293 ± 7	285 ± 5
Peso del Corazón (g)	1,0 ± 0.02	1,04 ± 0.04
Presión Arterial (mmHg)	113 ± 5	107 ± 3
Longitud del Miocito (μm)	132 ± 12	129 ± 8

B) Densidad de los canales de Ca^{2+} tipo L

El tratamiento crónico con nifedipina durante 28 días indujo un aumento de los receptores de DHP en membranas cardíacas de rata.

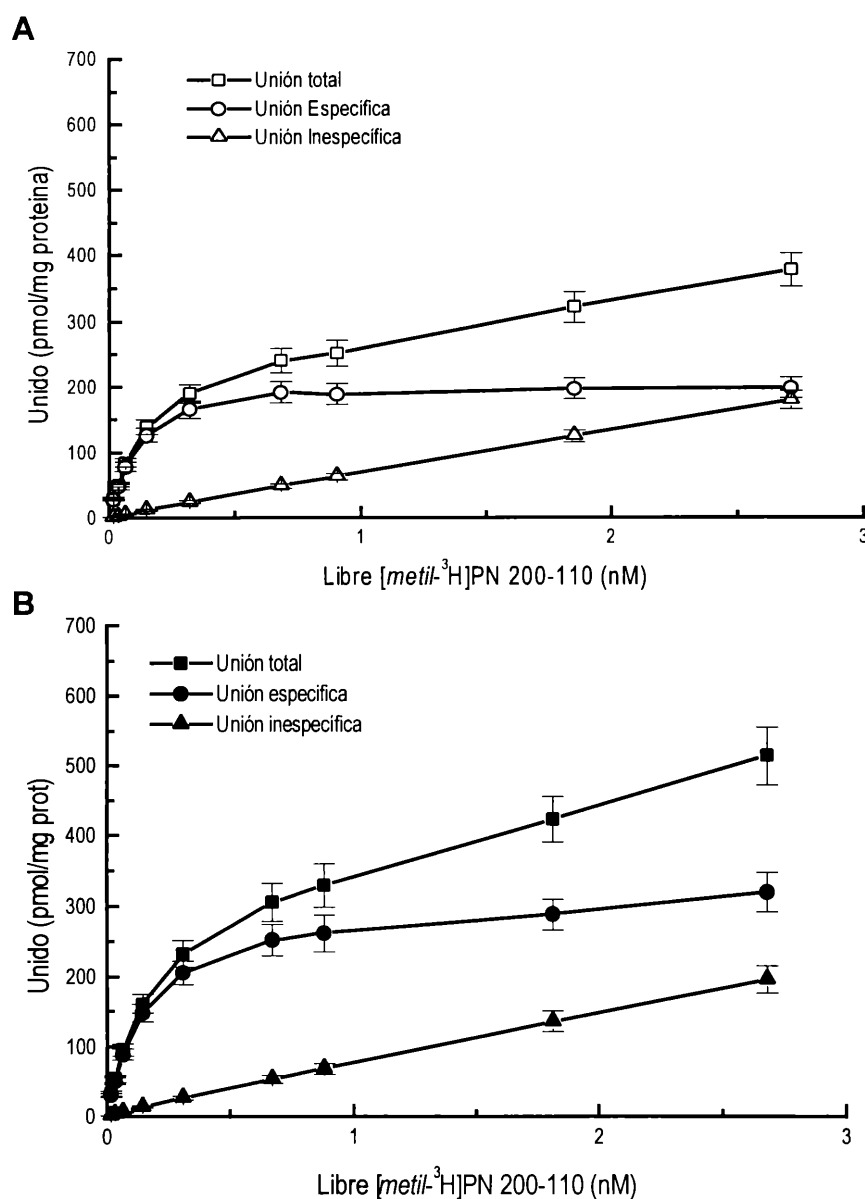


Figura 11. Unión total, específica e inespecífica de [metil-³H] PN 200-110 a membranas ventriculares de (A) grupo control (n=14) y (B) de ratas tratadas con nifedipina (n=11). Los puntos de corresponden a la Media \pm ES de todos los experimentos.

La Figura 11 muestra los resultados de la unión total, específica e inespecífica de la DHP a membranas cardíacas de ratas no tratadas (Control) y tratadas con nifedipina en función de la [DHP]. La unión específica se obtuvo previa determinación de los valores de la unión total e inespecífica. Los resultados de las determinaciones en el equilibrio de esta unión al receptor con concentraciones crecientes de metil-[³H]PN 200-110 (de 0.01 a 2.7 nM) mostraron que esta unión de la DHP a las membranas cardíacas de rata alcanza la saturación. La unión inespecífica no superó el 30% de la específica al comienzo de la saturación. El ajuste de las curvas de unión específica al receptor de DHP para las ratas controles y tratadas con nifedipina es comparado en la Figura 12.

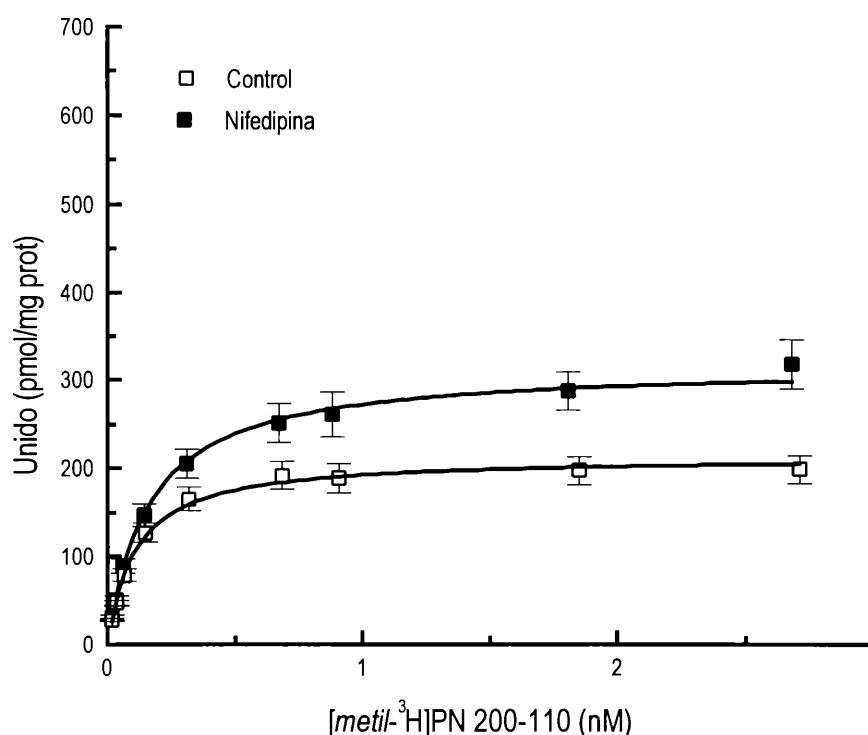


Figura 12. Unión específica del [metil-³H] PN 200-110. El ajuste de los puntos obtenidos de la unión específica al receptor de DHP se realizó de acuerdo a la ecuación de la hipérbola donde $B=B_{max} * X/K_d + X$.

El análisis de Scatchard de los resultados anteriores se muestran en la Figura 13 (A y B). Se observa que los sitios de unión máxima de metil-[³H]PN 200-110 a membranas ventriculares de ratas tratadas con nifedipina aumentó significativamente ($B_{max} = 310 \pm 21$ fmol/mg) con respecto al control ($B_{max} = 222 \pm 19$ fmol/mg de proteína) ($P < 0.05$).

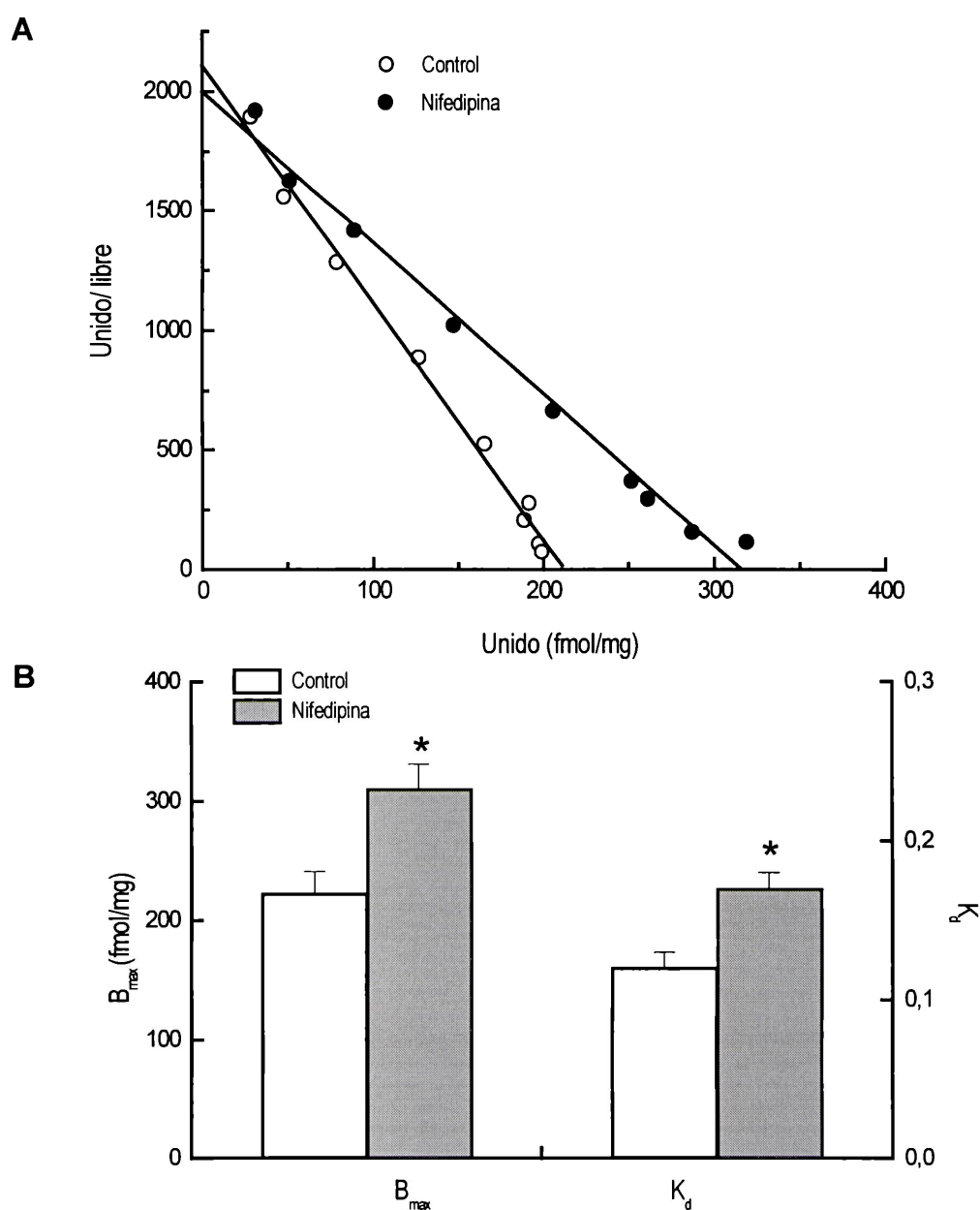


Figura 13 (A). Representación gráfica del análisis de Scatchard con los valores mostrados en las figuras 1 y 2. **(B).** Valores de la Media \pm ES de K_d y B_{max} (Control, $n=14$, nifedipina, $n=11$). (*) $P < 0.05$ vs Control.

La afinidad de la DHP metil-[³H]PN 200-110 por el receptor fue significativamente menor en los animales tratados con nifedipina con valores de K_d igual a 0.12 ± 0.01 nM y 0.17 ± 0.01 nM para control y tratados respectivamente ($P < 0.01$). Los valores de la media \pm ES de B_{max} y K_d graficados en la Figura 13-B se calcularon a partir de los valores obtenidos por el método de Scatchard de cada experimento. La posibilidad de que exista más de un sitio de unión con distinta afinidad por la DHP se descartó debido a que el coeficiente de Hill (n) calculado fue $n=1$.

C) Medida de Acortamiento y “Transients” de calcio

Con la finalidad de estudiar si el aumento de los sitios de unión al receptor de DHP luego del tratamiento con nifedipina se acompañó de un aumento del “transient” de Ca^{2+} se analizó esta etapa del proceso E-C en miocitos aislados.

La amplitud del “transient” de Ca^{2+} , tomado como la diferencia entre el Ca^{2+} sistólico y diastólico, fue evaluada a dos concentraciones de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_0$) de 1 y 2 mM. Para ambas concentraciones de calcio, el “transient” fue mayor en miocitos de ratas tratadas con nifedipina, respecto a los miocitos de ratas no tratadas.

En el panel superior de la Figura 4-A se muestra un experimento típico del “transient” de Ca^{2+} realizado en miocitos de ratas controles y tratadas con nifedipina. Como ya se mencionó más arriba, el miocito fue perfundido sucesivamente con soluciones de K-H con $[Ca^{2+}]$ 1 y 2mM.

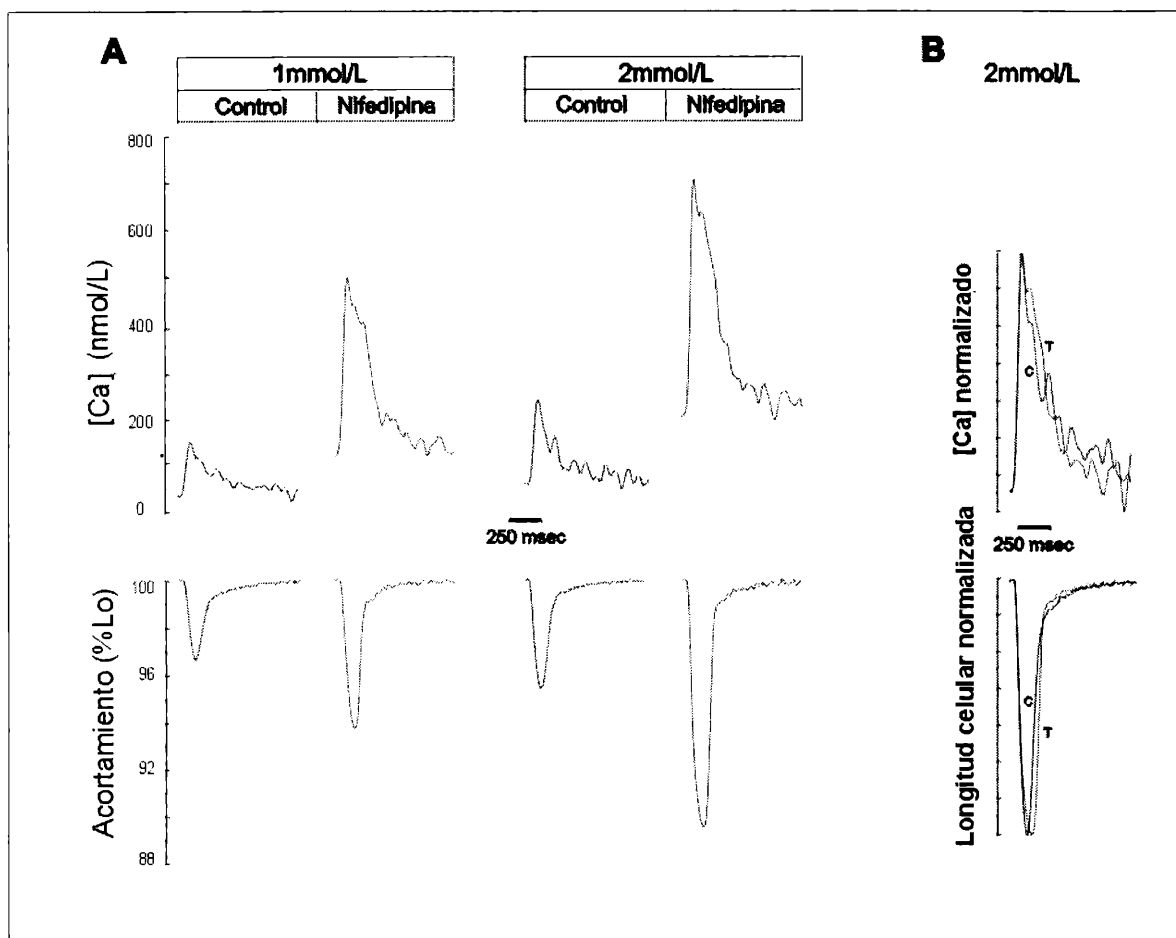


Figura 14. Trazos típicos para el “transient” de Ca^{2+} y acortamiento celular en miocitos de ratas controles y tratadas con nifedipina. (A), Registros simultáneos de “transient” de Ca^{2+} y acortamiento celular obtenidos a $[Ca^{2+}]_o$ 1 y 2mM. (B), Los trazos generados a $[Ca^{2+}]_o$ 2mM en A fueron normalizados y superpuestos, para mostrar el curso en el tiempo del “transient” de Ca^{2+} y acortamiento en miocitos de ratas controles y tratadas con nifedipina.

Los registros fueron obtenidos luego de un período de estabilización del miocito en cada solución. Con el objeto de reducir al mínimo la pérdida de fluorescencia, los miocitos se expusieron a la luz UV solamente durante el tiempo de registro en el que se producían tres

acortamientos sucesivos. En estos experimentos en particular, la amplitud del "transient" de Ca^{2+} fue 142 nM (Control) y 365 nM (nifedipina) a 1 mM $[\text{Ca}^{2+}]_0$, y aumentó a 179 nM (Control) y 480 nM (nifedipina) a 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_0$.

Teniendo en cuenta el aumento en la amplitud y en el pico sistólico del "transient" de Ca^{2+} , si no hubo cambios en la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} debido al tratamiento crónico con nifedipina, se debería esperar un aumento de la contractilidad. En el panel inferior de la Figura 14-A, cuando se comparan con los miocitos de ratas controles, se observa que el mayor "transient" de Ca^{2+} de los miocitos de las ratas tratadas con nifedipina (Panel superior) se corresponde con un mayor acortamiento (Panel inferior). En estos ejemplos el acortamiento celular fue 3.3% y 4.4% de la longitud inicial (L_0) para $[\text{Ca}^{2+}]_0$ 1 mM y 2 mM, respectivamente en los miocitos controles, y 6.5% ($[\text{Ca}^{2+}]_0$ 1mM) y 10.7% ($[\text{Ca}^{2+}]_0$ 2mM) de L_0 para los miocitos de ratas tratadas con nifedipina.

La Figura 15 muestra los resultados totales para los "transients" de Ca^{2+} realizados en 6 y 9 miocitos obtenidos de 4 ratas controles y 6 ratas tratadas con nifedipina respectivamente. La amplitud y el pico sistólico del "transient" de Ca^{2+} fueron aproximadamente el doble en los miocitos de ratas tratadas con nifedipina a las dos concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_0$ estudiadas. Aunque los valores de Ca^{2+} diastólico tienden a ser mayores en el grupo tratado, este aumento no alcanza valores estadísticamente significativos.

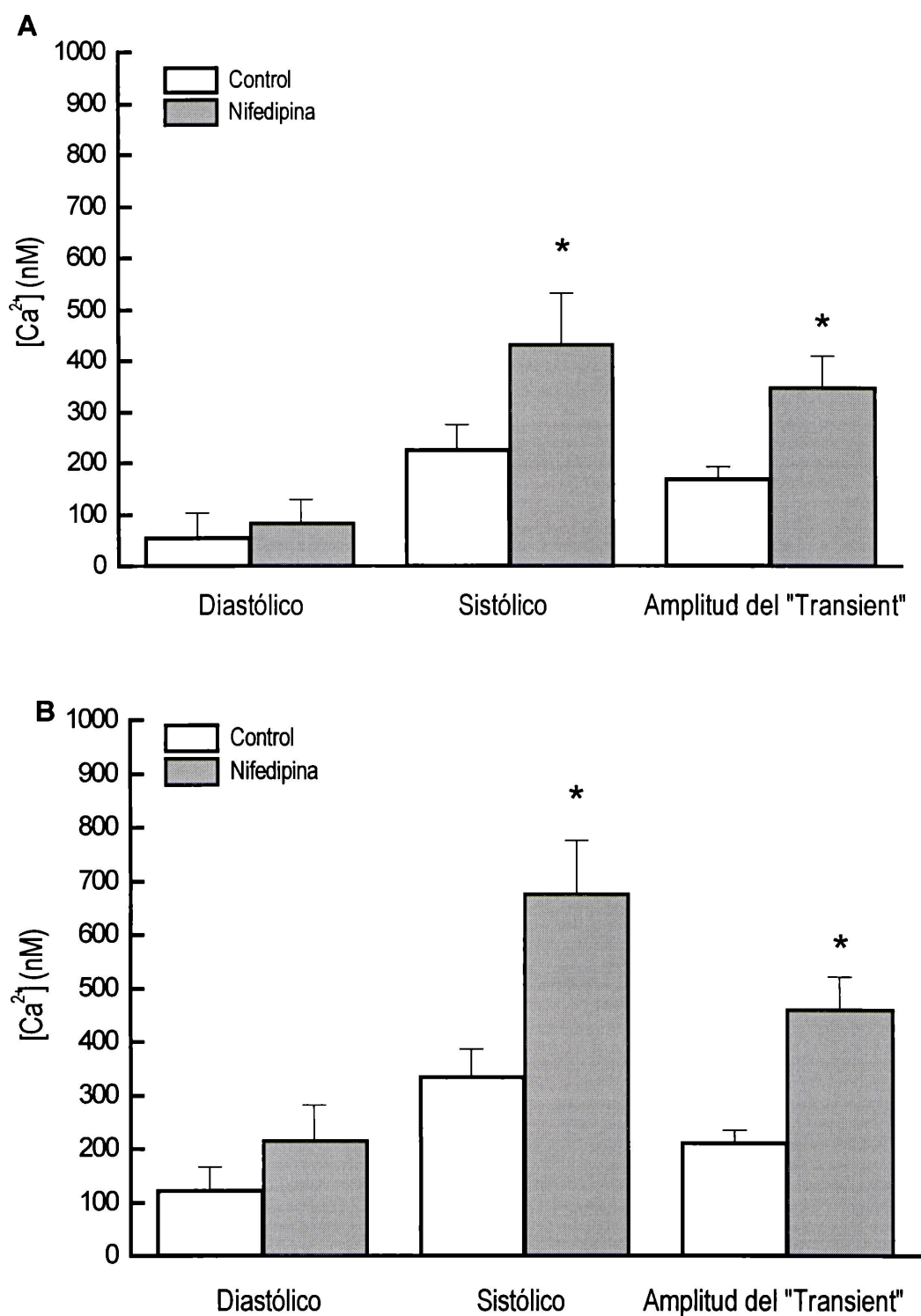


Figura 15. Resultados totales de $[Ca^{2+}]_i$ diastólico, sistólico y amplitud del "transient" evocados a $[Ca^{2+}]_o$ 1mM y 2 mM. (A) $[Ca^{2+}]_o$ 1mM y (B) $[Ca^{2+}]_o$ 2mM. Las barras muestran la Media \pm ES. (*) $P < 0.05$ versus Control.

La Figura 16 muestra los resultados totales de los parámetros de contractilidad obtenidos en miocitos cardíacos de ratas controles y tratadas con nifedipina. El acortamiento celular y la máxima velocidad de acortamiento fueron significativamente mayores en los miocitos de ratas tratadas con respecto a los pertenecientes a ratas controles.

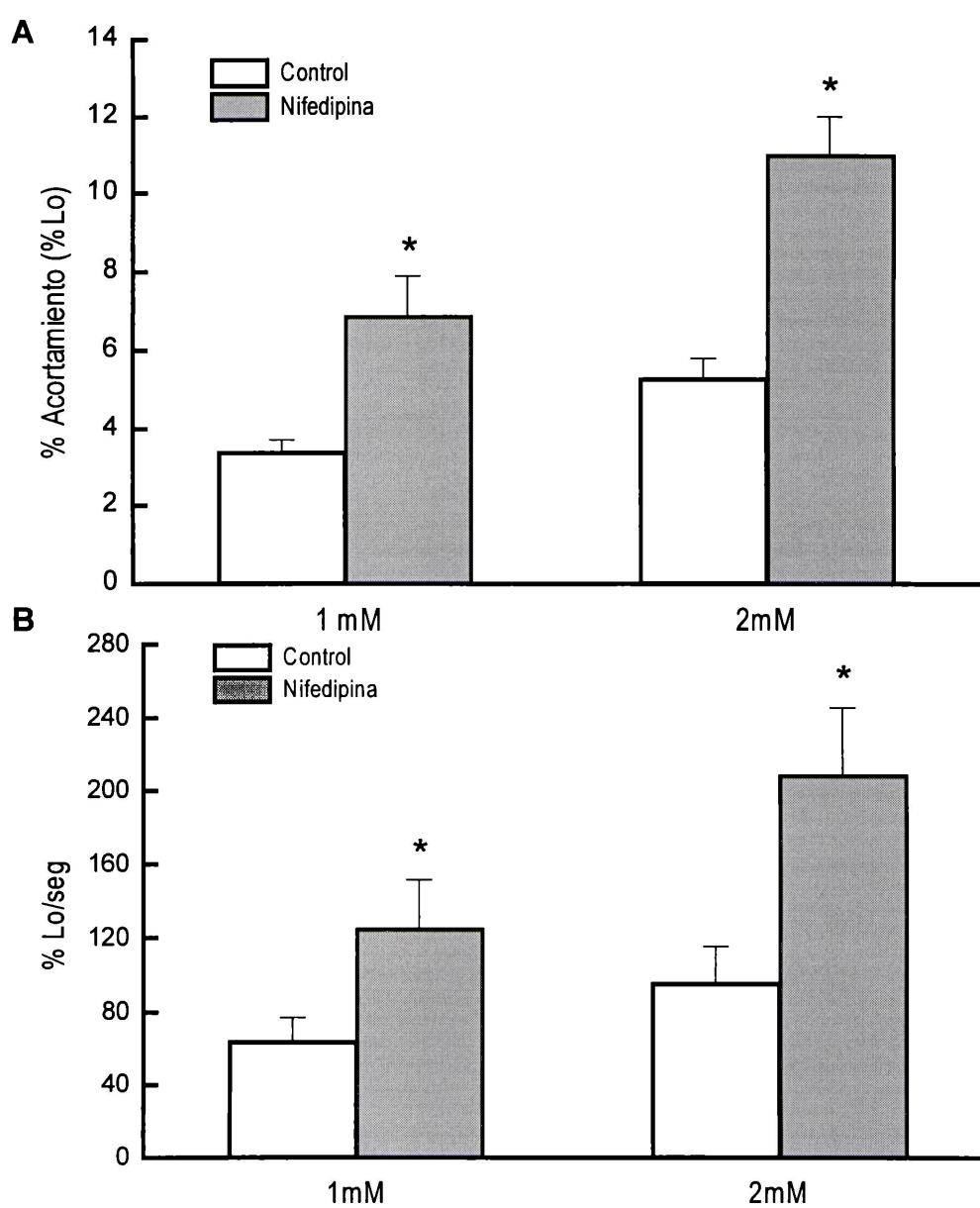


Figura 16. **A.** Acortamiento expresado como porcentaje de la longitud del miocito en reposo (Lo). **B.** máxima velocidad de acortamiento. Las barras muestran la Media \pm ES. (*) $P < 0.05$ versus Control.

Cuando se aumenta la $[Ca^{2+}]_o$ de 1mM a 2mM, el incremento en el "transient" de Ca^{2+} de $61 \pm 19\%$ se corresponde paralelamente con un aumento en el pico del acortamiento de $62 \pm 14\%$ (n=6) en miocitos controles y $79 \pm 22\%$ y $72 \pm 15\%$ (n=9) respectivamente en miocitos tratados con nifedipina.

El aumento obtenido en el "transient" de Ca^{2+} en miocitos de ratas tratadas con nifedipina, generado tanto a 1mM como a 2mM de $[Ca^{2+}]_o$, fue de aproximadamente un 100% con respecto a los miocitos controles. Dicho aumento en el "transient" de calcio estuvo asociado con un aumento similar en el acortamiento celular.

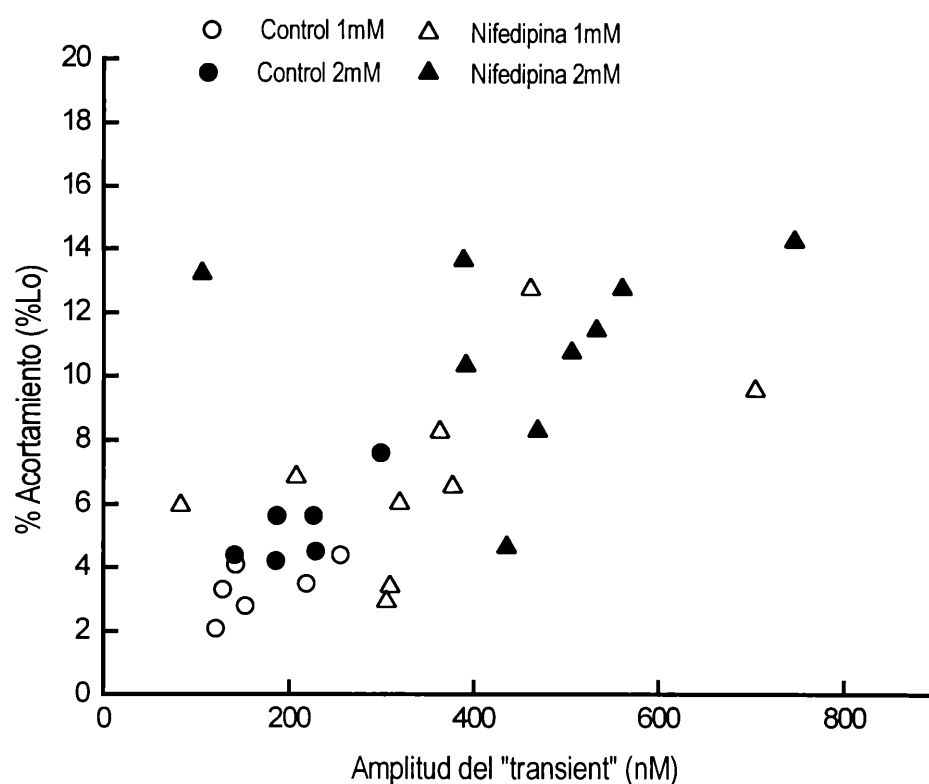


Figura 17. Acortamiento celular en función de la correspondiente amplitud del "transient" de calcio a $[Ca^{2+}]$ 1 y 2 mM.

Este efecto sobre la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+} se caracterizó por el estudio de la relación entre acortamiento celular y la amplitud de los "transients" de calcio en miocitos de ratas controles y tratadas (Figura 17).

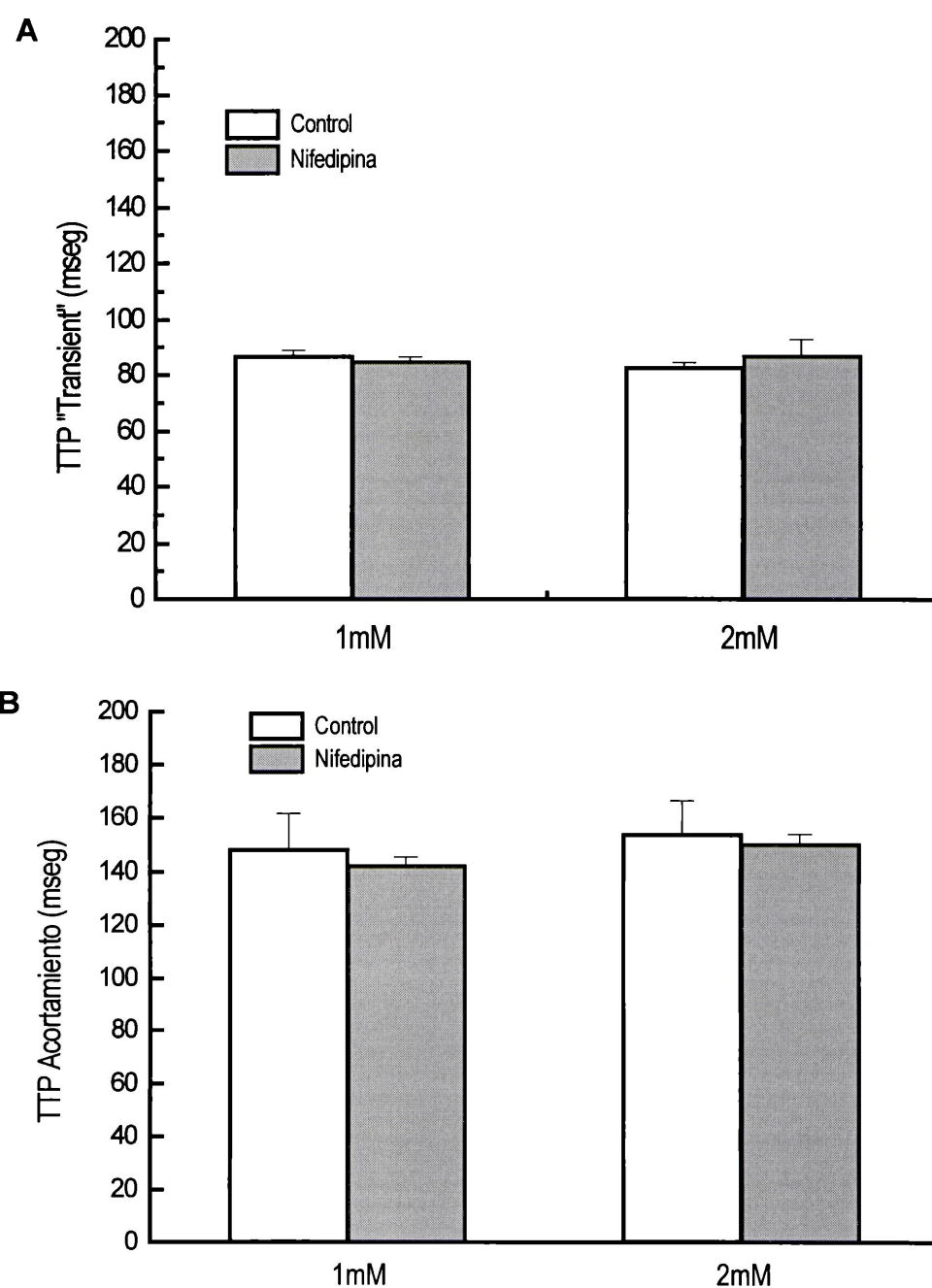


Figura 18. Tiempo en alcanzar el máximo acortamiento celular (TTP acortamiento en **A**) y "transient" de calcio celular (TTP "transient" en **B**). Las barras muestran la Media \pm ES (Control $n=6$, Tratados $n=9$).

La relación que siguen los parámetros mencionados para ambos grupos de ratas es similar, lo cual sugiere que el tratamiento crónico con nifedipina no produce cambios en la respuesta de los miofilamentos al Ca^{2+}_i .

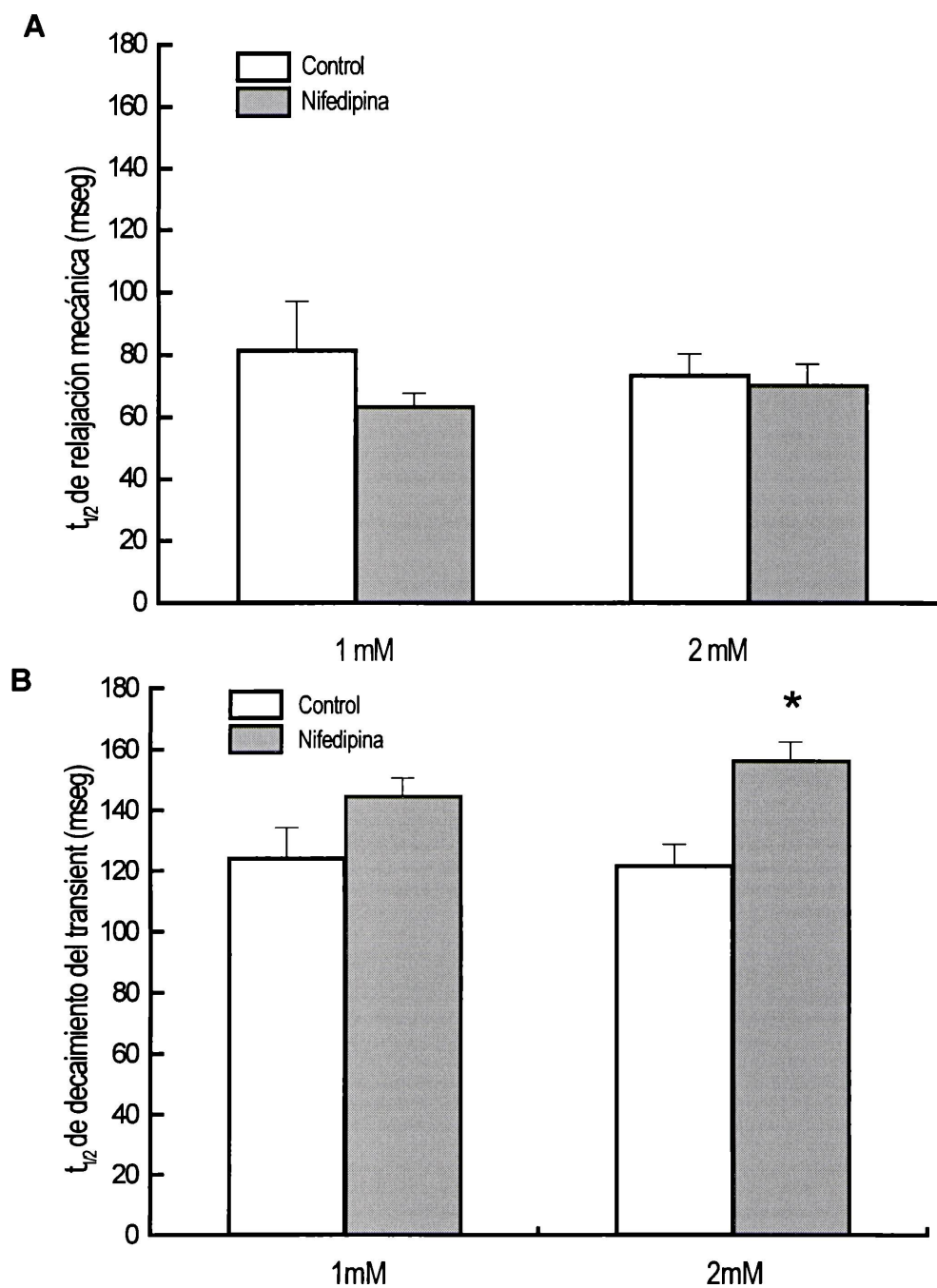


Figura 19. (A). Tiempo medio de decaimiento del "transient" ($t_{1/2}$ "transient"). **B.** Tiempo medio de relajación mecánica ($t_{1/2}$ relajación). Las barras muestran la Media \pm ES. Control, $n=6$ y nifedipina, $n=9$. (*) $P < 0.05$.

Para completar el estudio del acortamiento celular así como el del “transient” de calcio se analizó el desarrollo en el tiempo de los mismos. Esto se realizó midiendo el tiempo que tarda en alcanzar el punto máximo (TTP) del acortamiento y del “transient” de calcio (Figura 18, A y B).

El TTP del acortamiento y el TTP del “transient” de calcio de todos los registros no mostró diferencias significativas entre los miocitos controles y tratados (Figura 18).

La relajación mecánica del miocito se evaluó a través del tiempo que tarda en alcanzar la mitad del máximo acortamiento logrado ($t_{1/2}$), considerado desde el tiempo en alcanzar el pico de máximo acortamiento. Los resultados de todos los experimentos muestran que no hay diferencias significativas en la relajación mecánica entre los miocitos controles y tratados con nifedipina a las dos concentraciones de $[Ca^{2+}]_o$ estudiadas (Figura 19, A).

Cuando se evaluó paralelamente el tiempo tardado hasta alcanzar el 50% de decaimiento del “transient” de Ca^{2+} , medido desde el TTP, se observó una tendencia a ser mayor en los miocitos tratados que en los controles, que alcanzó a ser un aumento estadísticamente significativo solo a $[Ca^{2+}]_o$ 2mM. Este hecho se puede observar en los trazos normalizados del “transient” de Ca^{2+} mostrado en la Figura 14-B.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de tratamiento crónico con nifedipina sobre la densidad y la funcionalidad de los canales de calcio tipo L en el corazón de rata. La nifedipina es una DHP que se une específicamente a la subunidad α_1 del canal L de Ca^{2+} y puede ser usada para la cuantificación de estos canales (36). Nuestros resultados muestran que el tratamiento prolongado con nifedipina produjo un aumento del número de sitios de fijación al receptor de [metil- ^3H] PN 200-110 (B_{max}) en membranas cardíacas de rata. Estos resultados han sido observados previamente en el corazón de ave (20) y de conejo (22,23). En dichos estudios también se evaluó la densidad de canales de Ca^{2+} con la DHP [metil- ^3H] PN 200-110. Los valores de B_{max} obtenidos en corazones de conejo controles fueron similares a los del presente trabajo en la rata.

Otros estudios en corazón de mamífero, luego del tratamiento crónico con bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tipo L, revelaron resultados diferentes. Los estudios de Nishiyama y col. (76) mostraron que no existen cambios ni en el B_{max} ni en la afinidad de los canales (Kd) luego del tratamiento crónico con nifedipina. Más tarde los estudios de Gengo y col. (38) mostraron que el tratamiento crónico produce una disminución en el B_{max} sin cambios en la afinidad. Wagner y col. (89) observaron que cuando trataron crónicamente a humanos que padecían de miocardiopatía hipertrófica, con bloqueantes de los canales de Ca^{2+} tipo L, no se observaron cambios en el B_{max} ni en la afinidad (Kd), en concordancia con Nishiyama y col (76). Este último estudio y el de Gengo

y col. (38) a semejanza de los nuestros, se realizaron en ratas y sin embargo, los resultados muestran diferencias importantes entre sí en los valores controles de B_{max} , (91 fmol/mg y 600 fmol/mg proteína respectivamente) y con los obtenidos en el presente trabajo (222 fmol/mg de proteína). Estas diferencias en el B_{max} podrían explicarse al menos en parte por las diferentes cepas de ratas que se utilizaron en dichos estudios.

El número de sitios de unión específicos de DHP ha sido tomado como una medida apropiada de los canales de Ca^{2+} tipo L. La relación entre los sitios de unión específicos de DHP y canales de Ca^{2+} tipo L funcionales es controvertida. Estudios anteriores llevados a cabo en miocitos de corazón de pollo (6) y en músculo esquelético de rana (82) mostraron que el número de sitios de unión de DHP, determinados por el "binding" de PN 200-110, podría ser entre 50-100 veces superior al número de canales de Ca^{2+} funcionales determinados midiendo corriente de Ca^{2+} . Esto sugeriría que la mayoría de los sitios de unión de DHP no representan canales de Ca^{2+} funcionales. Sin embargo, Lew y col. (64) trabajando con miocitos ventriculares de conejo demostraron que la mayoría de los receptores de DHP en músculo cardíaco eran canales de Ca^{2+} tipo L funcionales. En nuestro estudio se demuestra que son canales funcionales ya que el aumento del B_{max} se corresponde con un aumento del "transient" de Ca^{2+} y de la respuesta contráctil en miocitos cardíacos. Por otra parte dicha funcionalidad de los canales se comprobó además por el aumento significativo de la corriente de Ca^{2+} a través de estos

canales ($I_{Ca,L}$) en miocitos cardíacos de ratas tratadas previamente con nifedipina (74). Estos resultados están de acuerdo con los informados en un trabajo previo donde se demostró un aumento de los canales de Ca^{2+} tipo L funcionales en el corazón isovolúmico perfundido de conejos (23).

Estudios de Le Grand y col. (60) en miocitos aislados de aurícula humana encontraron que el tratamiento crónico con antagonistas cálcicos genera una disminución significativa de la $I_{Ca,L}$. En un trabajo posterior, Mewes y Ravens, (72) trabajando con la misma técnica y utilizando una preparación similar, no encontraron diferencias significativas entre la amplitud de $I_{Ca,L}$ en miocitos auriculares de pacientes tratados con y sin antagonistas cálcicos, contradiciendo los resultados de Le Grand y col (60). Mewes y Ravens refieren sus resultados al trabajo previo de Wagner y col (89) donde mostraron que no hay cambios en los receptores de DHP en miocitos auriculares de pacientes tratados y no tratados con antagonistas cálcicos, pero como ya señalamos más arriba, se trataba de pacientes con miocardiopatía hipertrófica, que además recibían simultáneamente otros medicamentos. Mewes y Ravens midieron la $I_{Ca,L}$ en un número bajo de células ventriculares de pacientes tratados con antagonistas cálcicos (5.5 ± 2.0 pA/pF; n=3, 2 pacientes) y no tratados (1.8 ± 0.3 pA/pF; n=3, 2 pacientes). Si bien consideran que la amplitud de $I_{Ca,L}$ no fue diferente entre en los pacientes tratados y los no tratados, los valores muestran una tendencia a ser mayores en los primeros, lo que estaría de acuerdo con los resultados obtenidos en miocitos de rata (74). Las discrepancias entre nuestros resultados y los de la literatura podrían

atribuirse a 1) diferencias de especies, 2) dosis, forma de administración y duración del tratamiento con nifedipina. Al respecto podemos mencionar que la nifedipina fue administrada *vía* endovenosa o subcutánea con liberación continua de 36 y 360 μ g/kg/h (38), *vía* oral dos veces por día 50mg/kg/día (76) o una dosis diaria 10mg/kg/día (74). Esto conduciría a obtener niveles plasmáticos de droga diferentes. 3) Diferencias en el procedimiento para la preparación de membranas cardíacas y en la determinación de unión al receptor ("binding").

La afinidad de las DHP por el receptor varía según las condiciones, tales como la concentración de iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), pH, temperatura así como con el estado de activación del canal. El estado de mayor afinidad del canal es el estado inactivo, que prevalece en las preparaciones de membranas aisladas (39). La afinidad por el receptor fue evaluada por la constante de disociación (K_d) de la DHP metil- ^3H PN 200-110. Los valores de K_d obtenidos en este trabajo, si bien son menores a los obtenidos en tejido cardíaco de conejo están en el orden de magnitud (nanomoles/litro) descritos en la bibliografía (38,39,69,76). En la Figura 13, B se muestra una disminución significativa de la afinidad de la DHP metil- ^3H PN 200-110 en los animales tratados con nifedipina con valores de K_d de 0.12 ± 0.01 y 0.17 ± 0.01 nM para control y tratados respectivamente ($P < 0.01$). La causa de esta disminución en la afinidad podría explicarse por la presencia de nifedipina residual en las preparaciones de membranas cardíacas de rata. De este modo, la nifedipina residual competiría con el metil- ^3H PN 200-110 en la unión al

canal de Ca^{2+} tipo L generando una aparente reducción de la afinidad. Un proceso similar fue descrito por Aarons y col. (3), en el cual el aumento de receptores β en linfocitos posterior al tratamiento con propranolol estaba asociado a una reducción de la afinidad atribuida a la presencia de propranolol residual en la membrana. De todos modos la reducción en la afinidad detectada no debería afectar la máxima capacidad de unión de la DHP que fue determinada a una concentración de radioligando saturante.

Si el aumento del número de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática luego del tratamiento con nifedipina corresponde a canales funcionales, entonces podría esperarse un aumento en el "transient" de Ca^{2+} . Se debe tener en cuenta que este aumento transitorio del Ca^{2+} citosólico se produce no sólo a expensas del Ca^{2+} extracelular, sino también de Ca^{2+} almacenado en el retículo sarcoplasmático (RS). El influjo del Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L produce una mayor salida del RS de acuerdo al mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio. Es decir que se produce una amplificación de la señal de calcio que entra del espacio extracelular. Si el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L aumenta, éste gatilla a su vez una mayor salida de calcio desde el RS (86).

Nuestros resultados muestran que cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ es 1 mM los miocitos de ratas tratadas presentan un "transient" significativamente superior al de los controles. Este mismo fenómeno se repite cuando se aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ a 2 mM. De esta manera se demuestra que el mayor número de canales de Ca^{2+} tipo L en la membrana de los miocitos de

ratas tratadas crónicamente con nifedipina son funcionales, ya que permiten generar una mayor señal de Ca^{2+} , y como consecuencia un “transient” mayor. Teniendo presente la mecánica del proceso de contracción, un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólico debería producir un aumento del acortamiento celular, que es lo que realmente ocurre (Figura 14). Por otra parte, cabe hacer la pregunta de si el tratamiento crónico con nifedipina podría alterar además la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, ya que como se vio en la Figura 7 todo aumento de la contractilidad puede deberse a dos causas, aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y aumento de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles. Aunque esto último ocurriera, no invalidaría nuestras conclusiones de que el aumento de la contractilidad es producida, por lo menos en gran parte, por un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y que los canales son funcionales. Esta posibilidad, se estudió graficando la relación entre la variación en el acortamiento celular y el “transient” de Ca^{2+} producido por aumentar el $[\text{Ca}^{2+}]_o$ de 1 mM a 2 mM en ratas tratadas y controles. De esta manera, no pudieron ser detectadas diferencias significativas en la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles entre ratas tratadas y controles (Figura 17). Esto indicaría que el aumento de la contractilidad observada en los animales tratados fue debido únicamente a la mayor entrada de Ca^{2+} por los canales.

El análisis del acortamiento celular y del “transient” de Ca^{2+} en función del tiempo mostró que no existen diferencias significativas en el tiempo que tardan en alcanzar el pico del acortamiento celular (TTPS) y

del "transient" de calcio (TTPT) en ambos grupos de células. Por otro lado, el desarrollo en el tiempo de los registros es el que normalmente se encuentra descrito en la bibliografía (56) con el TTPT de ~50 ms y el TTPS mas lento de ~150 ms. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico con nifedipina produjo un aumento de la máxima velocidad de desarrollo del "transient" y del acortamiento. Esto en conjunto con la ausencia de cambios en los TTPS y TTPT determina un aumento del pico del "transient" y del pico del acortamiento como ya se discutió. Por otro lado, el tiempo medio de decaimiento (al 50% del pico) para el "transient" muestra un aumento en las ratas tratadas respecto de las controles, que no alcanza a ser significativo para $[Ca^{2+}]_o$ de 1mM, mientras que sí lo es para $[Ca^{2+}]_o$ de 2mM. La causa de esta prolongación del "transient" de Ca^{2+} , no fue explorada, y podría sugerir una saturación de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} de la célula. Sin embargo, esto debería haberse acompañado por un aumento del $t_{1/2}$ del acortamiento, que no fue encontrado. Otra posibilidad es que el gran acortamiento del miocito que ocurre a 1 mM y más aún a 2 mM produzca una disociación de los puentes cruzados con liberación del calcio al citosol (51,90). Ha sido descrito que todas las perturbaciones mecánicas de la longitud del músculo como el acortamiento isotónico (que es el caso de nuestros experimentos), el estiramiento y la liberación rápida del músculo, y las vibraciones longitudinales, causan disociación de puentes cruzados de miosinas generadores de fuerza y producen una liberación del Ca^{2+} de la TnC que altera el "transient" de Ca^{2+} (90). Aplicado a nuestros resultados,

este desprendimiento de Ca^{2+} de la TnC podría ser detectado, en nuestras condiciones, sólo cuando se produce una reducción importante de la longitud del sarcómero como la que ocurriría en el pico del acortamiento cuando se aumenta la $[\text{Ca}^{2+}]_o$ a 1 mM y más aún a 2mM ($L > 10\% L_o$) en las ratas tratadas. Esto se manifestaría como una prolongación del $t_{1/2}$ del “transient” de Ca^{2+} sin cambios paralelos del $t_{1/2}$ de acortamiento debido a la inactivación que produce el acortamiento. El análisis de los tiempos de relajación permitió detectar cambios en la respuesta al Ca^{2+} , producidos por el acortamiento “per se”, que no se detectaron en el análisis del “transient” de Ca^{2+} vs acortamiento de la Figura 17. Aunque en este análisis de la pendiente de la recta correspondiente a los miocitos tratados fue levemente menor que la de los miocitos de ratas controles, esta diferencia no fue significativa. Por otra parte es importante destacar que el análisis de los tiempos de relajación revelaría, si nuestra interpretación es correcta, cambios en la sensibilidad que no serían consecuencia de la intervención en sí misma, sino del mayor acortamiento que produce la intervención

El o los mecanismos que inducen a que el miocardio aumente el número de canales de calcio tipo L después del tratamiento crónico con DHP se desconocen. El aumento del número de canales tipo L puede ser el resultado del aumento de la síntesis o una disminución de la degradación como consecuencia de la ocupación de canales con el antagonista. Se podría especular que la disminución del influjo de Ca^{2+} dispara señales que involucran posiblemente a la proteína kinasa C,

fosfatasas endógenas o el ciclo de la calpaína. Estas señales intracelulares podrían iniciar los mecanismos necesarios que conducen ya sea a un aumento de las proteínas del canal o a la disminución de la degradación del mismo.

Para concluir, nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con la DHP nifedipina induce en el miocardio de rata un aumento de los canales de Ca^{2+} tipo L y que estos son funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aarons RD, Molinoff PB. Changes in the density of *beta* adrenergic receptor in rat lymphocytes, heart and lung after chronic treatment with propranolol. *J Pharmacol Exp Ther.* 221: 439-443, 1983.
- 2) Aarons RD, Nies A, Gal J, Hegstrand LR, Molinoff PB. Decreased *beta* adrenergic receptor density on human lymphocytes after chronic treatment with agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 224: 1-6, 1983.
- 3) Aarons RD, Nies A, Gal J, Hegstrand LR, Molinoff PB. Elevation of *beta* adrenergic receptor density in human lymphocytes after chronic treatment with propranolol. *J Clin Inv.* 65: 949-957, 1980.
- 4) Adams B and Tanabe T. Structural regions of the cardiac Ca channel alpha subunit involved in calcium dependent inactivation. *J Gen Physiol.* 110:4, 379-89, 1997.
- 5) Aggarwal R, Shorofsky SR, Goldman L, Balke CW. Tetrodotoxin-blokable calcium currents; a third type of cardiac cell sodium current. *J Physiol (Lond)* 505:353-359, 1997.
- 6) Aiba S, Creazzo TL. Comparison of the number of the dihidropyridine receptors with the number of functional L-type calcium channels in embryonic heart. *Circ Res.* 72:396-402, 1993.
- 7) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. *Molecular Cell Biology of the Cell.* 3rd Edition, 1996.
- 8) Bassani JWM, Bassani R, Bers D. Calibration of Indo-1 and resting $[Ca]_i$ in intact rabbit myocytes. *Biophys J.* 68, 1453-1460, 1995.

- 9) Bassani R, Mattiazzi A, Bers D. CaMKII is responsible for activity dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 268 (Heart Circ Physiol 37): H703-712, 1995.
- 10) Bers DM, Fill M. Coordinated feet and dance of ryanodine receptors. *Science.* 281:790-791, 1998.
- 11) Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiov Res* 42:339-360, 1999.
- 12) Bers DM, Stiffel VM. Ratio of Ryanodyne to dihidropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am. J. Physiol.* 33:C1587-1593, 1993.
- 13) Bradford MM Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254, 1976.
- 14) Buñag RD. Vasodilatation in awake rats of tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol.* 34(2):279, 1973.
- 15) Butters CA, Tobacman JB, Tobacman LS. Cooperative. *J. Biol. Chem.* 272:13196-13202, 1997.
- 16) Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. Spatial non-uniformities in $[Ca^{2+}]$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys J.* 67:1942-1956, 1994.
- 17) Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science.* 268:1045-1049, 1995.

-
- 18) Caterall WA. Structure and function of voltage sensitive ion channels. *Science Wash. DC.* 242:50-61, 1988.
- 19) Chang and Hosey. Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J Biol Chem.* 263:18929-37, 1988.
- 20) Chapados RA E. J. Gruver, J. S. Ingwall, J. D. Marsh, and J. K. Gwathmey. Chronic administration of cardiovascular drugs: altered energetics and transmembrane signaling. *Am J Physiol.* 263 (*Heart Circ Physiol.* 32): H1576-H1586, 1992.
- 21) Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 262:740-744, 1993.
- 22) Chiappe de Cingolani GE, Mosca SM, Moreyra AE, Cingolani HE. Chronic nifedipine treatment diminishes cardiac inotropic responses to nifedipine: Functional up-regulation of dihydropyridine receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 240-246, 1996.
- 23) Chiappe de Cingolani GE, Mosca SM, Vila Petroff M, Cingolani HE. Chronic administration of nifedipine induces up-regulation of dihydropyridine receptors in rabbit heart. *Am J Physiol* 267 (*Heart Circ Physiol* 36): H1222-H1226, 1994.
- 24) Cingolani H, Houssay AB y colaboradores. Fisiología Humana de Houssay, 7^{ma} Ed. El Ateneo, 2000.

- 25)Collin T, Wang JJ, Nargeot J, Schwartz A. Molecular cloning of three isoforms of the L-type voltage dependent calcium channel beta subunit from normal human heart. *Circ Res.* 72:6, 1337-44, 1993.
- 26)Cooke R. Actomyosin interaction in striated muscle. *Physiol Rev.* 77:671-697,1997.
- 27)Cooper CL, Vandaele S, Barhanin J, Fosset M, Lazdunski M, Hosey MM. Purification and characterization of the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent calcium channel from cardiac tissue. *J Biol Chem.* 262(2): 509-12, 1987.
- 28)De Jongh KS, Warner C, Catterall, WA. Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol. Chem.* 266:3287-3293, 1990.
- 29)Doble A, Benavides J, Ferris O, Bertrand B, Menager J, Vaucher N, Burgevin MC, Uzan A, Gueremy C, Le Fur G. Dihydropyridine and peripheral type benzodiazepine binding sites: subcellular distribution and molecular size determination. *Eur J Pharmacol.* 119(3): 153-67, 1985.
- 30)Ellinor PT Yang J, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW. Ca²⁺ selectivity at a single locus high-affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron.*15: 5,1121-32, 1995.
- 31)Fabiato A, Fabiato J. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol.* 249:469-495,1975.

- 32) Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol.* 85:247-289, 1985.
- 33) Farmer BB, Mencina M, Williams ES, Watanabe AM. Isolation of calcium tolerant Myocytes from adult rat hearts: Review of the literature and description of the method. *Life Sc.* 33,1-18, 1983.
- 34) Ferry DR, Goll A, Glossmann. Photoaffinity labeling of the calcium channel.(-)-[3H]azidopine label a 165 kDa polypeptide, and evidence against [3H] dihydropyridine-isothiocyanate being calcium channel specific affinity ligand. *Biochem J.* 243(1): 127-35, 1987.
- 35) Fleckenstein, 3rd International Adalat Symposium. Amsterdam, Excerpta Medica, pp1-13, 1976.
- 36) Flokerzi V, Ruth P, Oeken J, Jung B, Hofmann F. The cardiac calcium channel: properties and regulation. *Horm Cell Regul.* 139:235-248, 1986.
- 37) Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev.* 77:699-729, 1997.
- 38) Gengo P, Attle Skattebøl, Moran JF, Gallant S, Hawthorn M, Triggle DJ. Regulation by chronic drug administration of neuronal and cardiac calcium channel, beta-adrenergic and muscarinic receptor level. *Biochem Pharmacol.* 37: 627-633, 1988.
- 39) Glossman H, Striessnig J. Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 114:1-105, 1990.

- 40) Gordon AM, Homsher E, Regnier M. Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev.* 80:853-924, 2000.
- 41) Gotoh Y, Imaizumi M, Watanabe M, Shibata EF, Clark RB, Giles WR. Inhibition of transient outward K^+ current by DHP Ca^{2+} antagonist and agonist in rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol* 260 (*Heart Circ Physiol* 29): H1737-H1742, 1991.
- 42) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem.* 260: 3440-3450, 1995.
- 43) Guazzi MD, De Cesare N, Galli C, Tamborini C, Salvioni A. Nitrendipine vs long acting nifedipine in mild, moderate and severe hypertension. *Angiology.* 37: 508-518, 1986.
- 44) Guazzi MD, Fiorentini C, Olivari MT, Bartorelli A, Necchi G, Polese A. Short- and long-term efficacy of a calcium-antagonistic agent (nifedipine) combined with methyldopa in treatment of severe hypertension. *Circulation* 61: 913-919, 1980.
- 45) Györke S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation: Control mechanism of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in heart. *Science.* 260:807-809, 1993.
- 46) Haase H, Karczewski P, Beckert R, Krause EG. Phosphorylation of the L-type calcium channel beta subunit is involved in beta-adrenergic signal transduction in canine myocardium. *FEBS Lett.* 335:2, 217-22, 1993.

- 47) Hofmann PA, Fuchs F. Evidence for a force-dependent component of calcium binding to cardiac troponin C. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 253:C90-C96, 1987.
- 48) Hofmann, F. Flockerzi V, Nastainczyk W, Ruth P, Schneider T. The molecular structure and regulation of the muscular calcium channel. *Curr Top Cell Regul.* 31:223-239, 1990.
- 49) Homsher E, Kim E, Bobkova A, Tobacman LS. Calcium regulation of the thin filament movement in an in vitro motility assay. *J Physiol.* 70:1881-1892, 1996.
- 50) Hosey MM, Lanzdusky, M. Calcium Channels: Molecular pharmacology, structure and regulation. *J Membrane Biol.* 104:81-105, 1988.
- 51) Housmans PR, Lee NK and Blinks JR. Active shortenings retard the decline of the intracellular calcium transient in mammalian heart muscle. *Science.* 221:159-161, 1983.
- 52) Huxley AF, Niedergerke R. Interference microscopy of living muscle fibres. *Nature.* 173:971-973, 1954.
- 53) Huxley HE, Hanson J Changes in the cross striations of muscle during contraction and stretch and their ultrastructural interpretation. *Nature.* 173:9731-976, 1954.
- 54) Jay SD; Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem.* 266:5, 3287-93, 1991.

- 55)Kaplan, NM. Calcium entry blockers in the treatment of hypertension. Current status and future prospects. *J Am Med Assoc.* 262: 817-823, 1989.
- 56)Katz AM, Leach NM. Differential effects of 1,4-dihydropyridines calcium channels blockers: Therapeutic implications. *J Clin Pharmacol.* 27: 825-834, 1987.
- 57)Katz AM. Physiology of the Heart. 2nd Edition, Raven Press, 1992.
- 58)Kendall Harden. Agonist-induced desensitization of the β -adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol Rev.* 35: 5-32, 1983.
- 59)Kuo TH; Tsang W; Wiener J. Photoaffinity labeling of the calcium channel antagonist receptor in the heart of the cardiomyopathic hamster. *Biochim Biophys Acta.* 900:1, 10-6
- 60)Le Grand B, Hatem S, Deroubaix E, Couetil JP, Coraboeuf E. Calcium current depression in isolated human myocytes after cessation of chronic treatment with calcium antagonists. *Circ Res.* 69: 292-299, 1991.
- 61)Leblanc N, Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science.*248:372-376, 1990.
- 62)Lee JA, Allen GA. Modulation of the cardiac calcium sensitivity. A new approach to increasing the strength of the heart. Oxford university press, 1993.
- 63)Lew WYW, Hrysko LV, Bers DM. Dihydropyridines receptors are primarily functional L-type calcium channels in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 69:1139-1145, 1991.

- 64) Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. Molecular Cell Biology 3rd Edition, Scientific American Books, 1995.
- 65) Ludbrook PA, Tiefenbrunn AJ, Reed FR, Sobel BE. Acute hemodynamic responses to sublingual nifedipine: Dependence on left ventricular function. *Circulation* 65:489-498, 1982.
- 66) Marsh JD, Barry WH, Smith TW. Desensitization to the inotropic effect of isoproterenol in cultured ventricular cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 223: 60-67, 1982.
- 67) McClellan GA, Weisberg A, Winegrad S. cAMP can raise or lower cardiac actomyosin ATPase activity depending on alpha adrenergic activity. *Am J Physiol. Heart Circ Physiol.* 2267:H431-H442, 1994.
- 68) McDonald KS, Moss RL. Osmotic compression of single cardiac myocytes eliminates the reduction in Ca²⁺ sensitivity of tension at short sarcomere length. *Circ Res.* 77:199-205, 1995.
- 69) McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, Pelzer DJ. Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 74:365-507, 1994.
- 70) McKillop DF, Geeves MA. Regulation of interaction between actin and myosin subfragment I: evidence for three states for the thin filament. *Biochem J.* 65: 693-701, 1993.
- 71) Metzger JM. Myosin binding induced cooperative activation of the thin filament in cardiac myocytes and skeletal muscle fibers. *Biophys J.* 68: 1430-1442, 1995.

- 72) Mewes T, Ravens. L-type calcium currents of human myocytes from ventricles of non-failing and failing hearts and from atrium. *J Mol Cell Cardiol.* 26:1307-1320, 1994.
- 73) Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature*, 340(6230):230-3, 1989.
- 74) Morgan PE, Aiello EA, Chiappe de Cingolani GE, Cingolani HE, Mattiazzi AR. Chronic administration of nifedipine induces up-regulation of functional calcium channels in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 31:1873-1883, 1999.
- 75) Moss RL. Ca^{2+} regulation of mechanical properties of striated muscle. *Circ Res.* 70:865-884, 1992.
- 76) Nishiyama T, Kobayashi A, Haga Y, Yamasaki N. Chronic treatment with nifedipine does not change the number of [3H]nitrendipine and [3H]dihydroalprenolol binding sites. *Eur J Pharmacol.* 121: 167-172, 1986.
- 77) Potter JD, Sheng Z, Pan BS, Zhao A. A direct regulatory role for troponin T and a dual role for troponin C in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 270: 2557-2562, 1995.
- 78) Puglisi JL, Yuan W, Bassani JW, Bers DM. Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels in rabbit ventricular myocytes during action potential clamp: influence of temperature. *Circ Res.* 85:e7-e16, 1999.

- 79)Regnier M, Martyn DA, Chase PB. The calcium sensitivity of steady-state force and force development kinetics in cardiac muscle is enhanced by 2-deoxy-ATP. (Abstract). *Biphsys J.* 78:141A, 2000.
- 80)Santana LF, Gomez AM, Lederer WJ JR. Ca^{2+} flux through promiscuous cardiac Na^+ channels: Slip-mode conductance Ca^{2+} . *Science.* 279:1027-1033, 1998.
- 81)Sato H, Blatter LA, Bers DM. Effects of $[Ca^{2+}]_i$, Ca^{2+} load and rest on Ca^{2+} spark frequency in ventricular myocytes *Am J Physiol.* 272:H657-H668, 1997.
- 82)Schwartz LM, McCleskey EW, Almers W. Dihydropyridines receptors in muscle are voltage-dependent but most are not functional calcium channels. *Nature.* 314:741-751, 1985.
- 83)Sommer JR. Comparative anatomy: in praise of powerful approach to elucidate mechanism translating cardiac excitation into purposeful contraction. *J Mol Cell. Cardiol.* 27:19-35, 1995.
- 84)Striessnig J; Grabner M; Mitterdorfer J; Hering F; Sinnegger MJ; Glossmann H. Structural basis of drug binding to L type Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol Sci.* 3: 108-15, 1998.
- 85)Takimoto K, Li D, Nerbonne JM, Levitan JS. Distribution, splicing and glucocorticoid-induced expression cardiac α_{1C} and α_{1D} voltage gated Ca^{2+} channels mRNAs. *J Mol Cell Cardiol.*29: 3035-3042, 1997.
- 86)Trafford AW, Diaz ME, Eisner DA. Coordinated control of cell Ca^{2+} loading and triggered release from sarcoplasmic reticulum underlies

- the rapid inotropic response to increased L-type Ca^{2+} current. *Circ Res.* 88: 195-201, 2001.
- 87) Vater W, Kroneberg G, Hoffmeister F, Saller H, Meng K, Oberdorf A, Puls W, Schlossmann K, Stoepel K. Pharmacology of 4-(2'-nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylic acid dimethyl ester (Nifedipine, BAY a 1040). *Arzneimittelforschung*. 22:1-8, 1972.
- 88) Vibert P, Craig R, Lehman W. Steric-model for activation of muscle thin filaments. *J Mol Biol.* 266: 8-14, 1997.
- 89) Wagner JA, Sax FL, Weisman HF, Porterfield J, McIntosh C, Weisfeldt MML, Snyder SH, Epstein SE. Calcium-antagonist receptors in the atrial tissue of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 320:755-761, 1989.
- 90) Wang Y, Yuanyuan X, Guth K, Kerrik WGL. Troponin C regulates the rate constant for the dissociation of force-generating myosin cross-bridges in cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 20: 645-653, 1999.]
- 91) Weisberg A, Winegrad S. Alteration of myosin cross-bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8999-9003, 1996.
- 92) Winegrad S. Cardiac myosin binding protein C. *Circ Res.* 84:1117-1126, 1999.
- 93) Xu C, Craig R, Tobacman L, Horowitz R, Lehman W. Tropomyosin positions in regulated thin filaments revealed by cryoelectron microscopy. *Bophys J.* 77:985-992, 1999.

- 94) Yatani A, Kunze DL, Brown AM. Effects of dihydropyridine calcium channel modulators on cardiac sodium channels. *Am J Physiol* 254 (*Heart Circ Physiol* 23): H140-H147, 1988.
- 95) Yatani A; Brown AM. The calcium channel blocker nitrendipine blocks sodium channels in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 57:868-675, 1985.
- 96) Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison on sarcolemmal calcium current channel in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol.* 493:733-746, 1996.
- 97) Zhou Z, January CT. Both T-and L-type Ca^{2+} channels can contribute to excitation-contraction coupling in cardiac Purkinje cells. *Biophys J.* 74:1830-1839, 1998.
- 98) Zühlke R, Reuter H. Ca^{2+} sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels depends on multiple cytoplasmatic aminoacid sequences of the α_{1C} subunit. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:6, 3287-94, 1998.
- 99) Zusman RM, Christensen DM, Federman EB, Ruddy TD, Miller DD, Boucher CA. Nifedipine but not propranolol, improves left ventricular systolic and diastolic function in patients with hypertension. *Am J Cardiol.* 64: 51F-61F, 1989.
- 100) Zusman, RM. *Am J Hypertens.* Left ventricular function in Hypertension. Relevance to the selection of the antihypertensive therapy. 2: 200S-206S, 1989.

DONACION.....
Fecha... 09-10-03
57092