



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**"Caracterización con resolución subcelular de los depósitos
intracelulares de calcio en células de músculo liso"**

T E S I S

Que Presenta:

M. en C. María Cristina López Méndez

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOQUÍMICA

Director de Tesis: Dr. Agustín Guerrero Hernández

Ciudad de México

Enero del 2018.

Durante mis estudios de doctorado conté con una beca asignada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) con el número de registro 377848.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Agustín Guerrero Hernández**, por abrirme las puertas de su laboratorio desde hace más de 8 años, cuando aún estaba en la carrera de ingeniería. Por mostrarme, con la pasión que lo caracteriza, el mundo tan amplio y hermoso de la ciencia, por contagiarme el gusto por la investigación. Además, por ser uno de los pilares más importantes en mi proceso de formación tanto humana, profesional y de investigación. Gracias por su paciencia y dedicación durante todos estos años, por exigir lo mejor de mí para superarme y ser mejor persona, cada día. **¡Gracias!**

A la **Dra. Angélica Rueda y Sánchez de la Vega**, por todo su apoyo incondicional, tanto a nivel académico y personal, por escucharme en todo momento, por apoyarme en los últimos meses del doctorado, porque además de ser una buena asesora, fue una excelente persona y amiga conmigo.

Al **Dr. Ubaldo García Hernández**, por toda su asesoría técnica y especializada en muchos de mis experimentos, ya que sin su apoyo no podría haber realizado muchos de los experimentos, aquí descritos. Por ser un excelente asesor, por no dejarme desfallecer en momentos difíciles, porque gracias a las colaboraciones con sus estudiantes, pude adentrarme un poco más en el mundo de las neurociencias.

Al **Dr. Guillermo Ávila Flores**, por su asesoría y por sus críticas constructivas que ayudaron en mucho a la mejora y explicación de mi proyecto, por sus sugerencias y comentarios hechos al respecto.

Al **Dr. Luis M. Montañó Ramírez**, por todo su asesoramiento y discusión de mi proyecto, por el tiempo que dispuso para mí al atenderme en su laboratorio en la UNAM, por sus sugerencias y comentarios hechos a la presente tesis.

Al **Dr. Jesús Alberto Olivares** y al **Dr. Ricardo Mondragón**, por su apoyo y asesoría como jefe departamental y como coordinador académico respectivamente.

A **todos los profesores del departamento de Bioquímica** que me aportaron muchos de sus conocimientos y me apoyaron durante mi larga estancia en dicho departamento.

A la **Bióloga Lucía García Romero**, por su tiempo y disponibilidad al enseñarme algunas técnicas cuando recién llegue al laboratorio, por sus grandes consejos y diferentes motivaciones, que me hicieron no decaer y seguir con el objetivo de finalizar mi doctorado, por todo lo aprendido.

A **Priscila González y Roció Arroyo** por su gran labor como secretarías, por apoyarme con todos los documentos académicos necesarios, por su gran disposición a cualquier duda o apoyo. Al **Ingeniero Oscar Torales** por su apoyo técnico y profesional en todo lo relacionado a computación.

Al **Ing. Roberto Arellano Ibarra**, por su ayuda técnica en la estandarización del proceso de deconvolución y por su apoyo como técnico de laboratorio.

A mi amiga **Nayeli Rivera**, porque gracias a su proyecto de doctorado colaboramos y logramos publicar un paper más, además que lo más importante fue aprender juntas un poco más sobre el mundo tan complejo e impresionante del calcio en neuronas, gracias por todo lo compartido y por tu bella amistad.

A mi amigo, **el Dr. Carlos Ortuño**, por su apoyo incondicional, por no dejarme sola cuando más lo necesitaba, por confiar en mí a pesar de la distancia.

A **mi amigo Leo**, un gran compañero del laboratorio, con el que compartí mucho de mi tiempo y por ende mucho de los conocimientos aprendidos en el Cinvestav, por ser además de un gran amigo, mi paño de lágrimas, ya que, gracias a él, este trayecto fue mucho más ameno y cordial.

A la **Dra. Edaena Benítez**, por todo lo que aprendí de ella, desde técnicas de laboratorio, hasta su ímpetu por no desfallecer en momentos realmente difíciles, por todo lo compartido.

A la **Dra. Norma Pérez**, por ser de las mejores compañeras y amigas que pude tener en el laboratorio, por las ayudas o comentarios hechos, por demostrar su amor y pasión por la ciencia.

A **Ericka Martínez y Víctor Hugo Sánchez**, por todo su apoyo, por ser excelentes amigos y compañeros de laboratorio, por compartir mucho de los momentos frustrantes y difíciles, durante el proyecto de investigación. Por ser un gran apoyo moral, cuando más lo necesite, gracias chicos.

A mi compañera y amiga de generación **Nohemí Camacho** con la que compartí muchas frustraciones durante los cursos teóricos, por ser una aliada durante este trayecto, por todo el tiempo compartido y por su bella amistad.

Al **Doctor Arturo Cabrera Hernández del ITSM** por siempre apoyarme y orientarme para poder adentrarme en el mundo de la investigación, por su sencillez y humildad al compartir su pasión por la ciencia, por ser un excelente profesor y por siempre creer en mí ¡Gracias!

Y no menos importante agradezco **a mis padres Alfredo López y Victorina Méndez**, por educarme, por ser el principal pilar en mi formación académica y humana, por creer en mí desde el primer día de mi vida, por apoyarme en todo lo respecto a mis estudios profesionales, por todo el tipo de apoyo que me brindan diariamente, por los sacrificios hechos para que cada uno de sus hijos, lograra sus objetivos. **Gracias por su compromiso y amor incondicional.**

A **mis hermanos Lucy y Martin Eduardo**, por ser, cada uno, en su forma, una motivación y un ejemplo a seguir, por todos los momentos compartidos, por el apoyo moral y económico que me dieron cuando más lo necesite, por ser los mejores hermanos, ¡Gracias!

Desde luego le doy gracias a Dios, por la vida, por la familia que tengo, por darme salud, por permitirme terminar este proyecto tan arduo y pesado para mí, además por conocer a mucha gente tan amable, gentil y humanitaria, que me han apoyado a lo largo de toda mi vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 El calcio intracelular.	5
1.2 El retículo endoplásmico/sarcoplásmico.....	7
1.3 Canales liberadores de calcio del RE/RS.....	10
1.4 La bomba ATPasa de Ca ²⁺ del retículo (SERCA)	11
1.5 El Receptor de Rianodina	16
1.6 Otros depósitos de Calcio.....	22
2. ANTECEDENTES	27
3. JUSTIFICACION.....	32
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVO GENERAL	33
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
7.1 Determinación de la función de dispersión de la luz (PSF) del microscopio confocal.	34
7.2 Obtención de células individuales a partir del tejido muscular de la vejiga del cobayo.....	36
7.3 Incorporación celular del Fura-Red, del Mag-Fluo-4 y de los indicadores para los diferentes orgánulos.....	37
7.4 Adquisición de imágenes por microscopia confocal y proceso de deconvolucion.	38
7.5 Desarrollo de los registros simultáneos de Mag-fluo-4 y fura-red.	41
7.6 Análisis de colocalización y cuantificación de la fluorescencia.	42
7.7 Calibración del sistema de perfusión usado en el microscopio confocal.....	46
7.8 Soluciones y sustancias.	48
7.9 Análisis estadístico	48
8. RESULTADOS.....	49
8.1 Obtención del límite de resolución real del microscopio confocal LSM-700 y resultados del proceso de deconvolución.	49
8.2 Determinación simultánea del efecto de cafeína tanto en el calcio citoplásmico como en el calcio luminal en células de músculo liso recién aisladas.	51

8.3 Uso de rianodina para identificar al RyR como canal que es activado por cafeína en los depósitos intracelulares de Ca ²⁺ reportados por Mag-Fluo-4.....	55
8.4 Efecto de la tapsigargina en el calcio citoplásmico y en el luminal, reportados por Fura-Red y Mag-Fluo-4, respectivamente.....	58
8.5 Uso de la bafilomicina y del cloruro de amonio (NH ₄ Cl) para identificar otro mecanismo de captura de Ca ²⁺ de los depósitos insensibles a tapsigargina.	61
8.6 Efecto de la combinación de bafilomicina y tapsigargina para determinar si existe un tercer tipo de depósito intracelular de Ca ²⁺	66
8.7 Análisis de colocación del indicador Mag-Fluo-4 con los colorantes para retículo endoplásmico, lisosomas y mitocondria.	71
8.8 Efecto de la ausencia de Mg ²⁺ en la señal del Mag-Fluo-4 en las células de músculo liso.....	73
9. DISCUSION	75
10. CONCLUSIONES.....	84
11. PERSPECTIVAS.....	86
12. BIBLIOGRAFIA	87

ABREVIATURAS

BF Bafilomicina

BHQ 2,5 Di-t-butil-1,4-

hidroquinona cADPR ADP ribosa
cíclica

CAFF Cafeína

[Ca²⁺]_i Concentración de calcio citoplásmica.

[Ca²⁺]_L Concentración de calcio luminal del retículo sarco/endoplasmico

CICR Liberación de calcio inducida por calcio

CPA Acido ciclopiazonico

CSQ Calsecuestrina

CTD Dominio del Carboxilo Terminal

DMSO Dimetil sulfóxido

EM Microscopia electrónica

F Fluorescencia

F₀ Fluorescencia basal

IP₃ 1, 4,5-trisfosfato de inositol

IP₃Rs Receptores de IP3

MLN Mioregulina

NAD⁺ Nicotinamida Adenina Dinucleotido oxidado

NAADP Ácido nicotínico adenina dinucleótido

fosfato NH₄Cl Cloruro de amonio

PMCA Bomba de calcio de la membrana celular

PLN Fosfolamban

PSF Función de dispersión de punto

RS Retículo

sarcoplásmico RE

Retículo endoplásmico

RyR Receptor de

Rianodina ROIs Regiones

de Interés

SERCA ATPasa de calcio del retículo sarco/endoplásmico (por sus siglas en inglés: Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase)SLN Sarcolipina

SOCE Entrada de calcio operada por el depósito

SPCA ATPasa de calcio de la vía secretora (Aparato de Golgi)

SS Solución Salina Normal

TMRE Tretrametil Rodamina Etil Ester Perclorato

TPC Canal de dos poros

TG Tapsigargina

VOCs Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

RESUMEN

La concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) regula diferentes procesos celulares, como son la contracción muscular, secreción de hormonas, neurotransmisión, respuestas al estrés, entre otros. Los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ suceden debido a la activación de canales permeables a Ca^{2+} que están en las membranas celulares, ya sea la plasmática o la de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} . El principal depósito intracelular de Ca^{2+} es el retículo sarcoplásmico (RS) en células musculares y el retículo endoplásmico (RE) en las células que no son musculares. El retículo cuenta con la bomba SERCA (inhibible por tapsigargina (TG)), la cual transporta Ca^{2+} en contra de su gradiente electroquímico para rellenar este depósito, al grado que la $[Ca^{2+}]$ libre dentro del retículo es del orden de 500 μ M, pero la gran mayoría del Ca^{2+} (del orden de mM) se encuentra pegado a proteínas y sale del retículo vía al menos dos canales liberadores de Ca^{2+} , el receptor de IP_3 (RIP₃) y el de rianodina (RyR), este último se activa por cafeína e inhibe por rianodina.

Sin embargo, existe otro depósito intracelular de Ca^{2+} de naturaleza ácida que estaría localizado en diferentes compartimentos vesiculares que serían el aparato de Golgi, los gránulos de secreción, las vesículas endo-lisomales, los lisosomas y/o vesículas endocíticas) y que liberan Ca^{2+} bajo condiciones no bien definidas. La principal característica de este tipo de depósito es que necesita un gradiente de H^+ para acumular Ca^{2+} en contra del gradiente electroquímico y por lo mismo son sensibles a inhibidores de la bomba de protones como sería la bafilomicina.

En trabajos previos, en diferentes tipos de células, se ha reportado el uso del Mag-fluo-4 como indicador de los cambios en la $[Ca^{2+}]_L$ pero sin resolución subcelular. Pareciese que este indicador tricarboxílico (a diferencia de mag-fura-2 y fluo-5N) se incorpora al interior del RE o del RS y, a partir de aquí, debido a la falta de un mecanismo de retención en el RE/RS, el colorante puede localizarse en otros compartimentos intracelulares. Esta aparente limitación funcionó a nuestro favor en este estudio, porque pudimos registrar los cambios en $[Ca^{2+}]_L$ en respuesta a la cafeína tanto en el RS como en otros depósitos reportados por este indicador. Además, se llevó a cabo el registro simultáneo del cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ medido por Fura-Red, con la ventaja de registrar estos cambios en regiones de interés (ROIs) de la célula, mediante el uso del microscopio confocal.

Los datos que obtuvimos nos permiten distinguir la presencia de tres diferentes depósitos intracelulares de Ca^{2+} , que todos responden a cafeína, pero que presentan tres mecanismos diferentes de rellenado de Ca^{2+} . El primer depósito cuenta con la bomba SERCA sensible a TG y con el RyR como canal liberador, por ende, sugerimos que sería éste el RS, que está presente en todas las regiones subcelulares, sin embargo, resulta que sólo el RS de la región perinuclear aporta el Ca^{2+} que se desplaza como una onda que viaja desde el núcleo hasta la periferia de la célula. El segundo tipo de depósito sería aquellos llamados ácidos porque requiere la actividad de una bomba de H^+ sensible a bafilomicina, y es inhibido por alcalinización con NH_4Cl , pero que también contiene al RyR. Estos depósitos fueron hallados principalmente en la región citoplásmica y superficial y mostraron un aporte muy limitado a la señal de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por cafeína. Finalmente, el tercer depósito tiene un mecanismo de rellenado de Ca^{2+} de naturaleza desconocida y que mostró, lo que pensamos sería un canal activado por cafeína, pero resistente a la rianodina. Éste se observó principalmente en la región superficial. Nuestros estudios de colocalización con el Mag-fluo-4 nos permite descartar a los lisosomas y las mitocondrias como depósitos intracelulares de Ca^{2+} reportados por Mag-fluo-4.

ABSTRACT

The intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) regulates different cellular processes, such as muscle contraction, hormone secretion, neurotransmission, stress responses, among others. Increases in the $[Ca^{2+}]_i$ result from the activation of Ca^{2+} permeable channels present in either plasma membrane or in those membranes of intracellular Ca^{2+} stores. The main intracellular Ca^{2+} store is the sarcoplasmic reticulum (SR) in muscle cells or the endoplasmic reticulum (ER) in non-muscle cells. The characteristic of SR is the presence of SERCA pump (inhibited by thapsigargin, TG) with free $[Ca^{2+}]_L$ in the order of 500 μ M, and a large amount of Ca^{2+} associated with buffer proteins, this Ca^{2+} is release by IP_3 receptor (RIP_3) and ryanodine receptor (RyR), the latter can be activated by caffeine and inhibited by ryanodine.

However, there are others vesicular compartments with the ability to accumulate Ca^{2+} referred as acidic Ca^{2+} stores (the Golgi apparatus, secretory granules, endo-lysosomes, lysosomes and / or endocytic vesicles) that can be released by still undefined conditions. The acidic Ca^{2+} store requires a proton gradient to accumulate Ca^{2+} and for this reason this store is sensitive to inhibitors of V-type proton pump as it is the case of bafilomycin.

Previous studies, in different cell types, have reported the use of Mag-fluo-4 to follow changes in the $[Ca^{2+}]_L$ but without subcellular resolution. It appears that this tricarboxylic indicator can be easily incorporated in the ER or in the SR when compared with other Ca^{2+} indicators (Mag-fura 2, Fluo 5N); the lack of mechanism for retention in the ER/SR makes this dye to end up in other intracellular compartments. This apparent limitation worked in our advantage in this study, because we were able to record changes in the $[Ca^{2+}]_L$ in response to caffeine both in the SR and other deposits reported by this indicator. Additionally, we have simultaneously recorded changes in the $[Ca^{2+}]_i$ measured with Fura-Red, and a surplus was the spatial resolution by recording changes in regions of interest (ROIs) using a confocal microscope.

The data obtained showed the presence of three different Ca^{2+} stores that were released by caffeine. The first type of Ca^{2+} store has SERCA pump inhibited by thapsigargin and RyRs as a Ca^{2+} release channel. We think this store is the SR and interestingly, only the perinuclear SR provides the Ca^{2+} involved in the caffeine-induced Ca^{2+} wave that travels from the perinuclear area to the surface of the cell. The second type of stores are called acidic because requires the activity of H^+ pump sensitive to bafilomycin and is inhibited by alkalization with NH_4Cl . Interestingly, it contains also RyRs, and is present in both the cytoplasmic and superficial regions. Additionally, this store has a relatively small contribution to the caffeine-induced Ca^{2+} wave. Finally, the third deposit has an unidentified Ca^{2+} loading mechanism and a caffeine-induced Ca^{2+} release mechanism that is insensitive to ryanodine. This store is localized mainly in the superficial cell region. Our colocalization studies with Mag-fluo-4 showed that neither lysosomes nor mitochondria are involved in the caffeine-induced Ca^{2+} responses leaving unanswered the nature of the acidic Ca^{2+} stores.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El calcio intracelular.

El calcio (Ca^{2+}) es el mineral más abundante en el cuerpo humano. Un 99% de este ion se encuentra en los huesos y en los dientes donde tiene un papel muy importante en la estructura de estos. El 1% restante se encuentra en tejidos y fluidos corporales donde es esencial para el metabolismo y fisiología celular, como la contracción muscular, la secreción glandular y la neurotransmisión.

El Ca^{2+} forma sales insolubles con aniones tanto inorgánicos como orgánicos, por ejemplo, carbonatos y fosfatos. Esto limita su solubilidad a concentraciones cercanas a 1 mM, por esta razón los polifosfatos orgánicos de calcio (nucleótidos, ácidos nucleicos, etc) son insolubles en agua. Las células utilizan los polifosfatos para almacenar energía e información, consideramos que ésta sería la razón de que la concentración citoplásmica de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) esté en niveles muy bajos, por lo general la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está alrededor de 100 nM, aproximadamente 4 órdenes de magnitud menor a la concentración de calcio extracelular que es de 2 mM (Williams 2006).

Las células llevan a cabo incrementos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizando una sofisticada maquinaria de proteínas para regular las señales del ion en regiones específicas de la célula y de una forma dependiente del tiempo. Esta maquinaria involucra la unión de Ca^{2+} a una variedad muy amplia de proteínas, las cuales experimentan cambios conformacionales que les permiten interactuar con otras proteínas, lo que resulta en la modificación de las actividades de enzimas y de canales iónicos o se transmiten cambios conformacionales a otras proteínas (Figura 1.1), (Berridge et al. 2003).

Los cambios en la concentración de calcio intracelular requieren de un conjunto de proteínas, que se resumen a continuación. En la membrana plasmática se involucra la participación de dos tipos principales de canales de Ca^{2+} 1) los operados por voltaje (VOC) y 2) aquellos independientes de voltaje (NVOC), estos últimos a su vez se dividen en canales activados mecánicamente (SAC), canales operados por vaciamiento del depósito (SOC) y canales operados por la activación de receptores (ROC) que se

encuentran en la membrana plasmática (Figura 1.2), (Montaño & Bazan-Perkins 2005; Guibert et al. 2008).

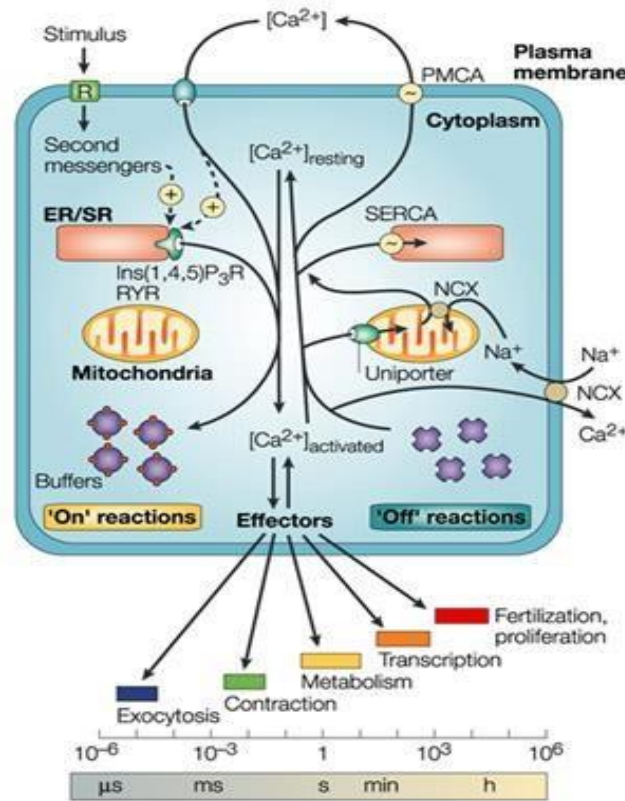


Figura 1.1 Señalización por calcio intracelular. El ingreso del Ca²⁺ al citoplasma a través de la membrana plasmática o del retículo sarco/endoplásmico (RS/RE) resulta en incrementos del ion calcio (reacciones *on*) que tienen diferentes efectores dependiendo del tipo de célula. Al mismo tiempo en las membranas tanto plasmática como del retículo se encuentran proteínas que disminuyen la [Ca²⁺]_i (reacciones *off*) hasta sus niveles basales. (Figura tomada de Berridge et al., 2003).

Otras proteínas importantes en la señalización por Ca²⁺ son aquellas que llevan a cabo su transporte en contra de su gradiente electroquímico, estas serían dos grandes grupos, las ATPasas y el recambiador Na⁺/Ca²⁺. El primer grupo contiene a las ATPasas de Ca²⁺ del retículo sarco/endoplásmico (SERCA), las ATPasas de la membrana plasmática (PMCA) y las ATPasas de la vía secretora (SPCA). El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ de la membrana plasmática es electrogénico y por lo mismo, tanto el sodio como el potencial de membrana afectan su actividad de transporte de calcio. Todos estos transportadores se activan a través del aumento de la [Ca²⁺]_i. Un tercer

elemento involucrado en la modulación de las señales de $[Ca^{2+}]_i$ sería la mitocondria, este organelo se asocia, en su mayoría, con las funciones relacionadas al

metabolismo de la energía y la fosforilación oxidativa, sin embargo se considera que desempeña un papel importante en la regulación y modulación de las señales intracelulares de Ca^{2+} debido a la presencia del uniportador y del recambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial (Delmotte et al. 2014).

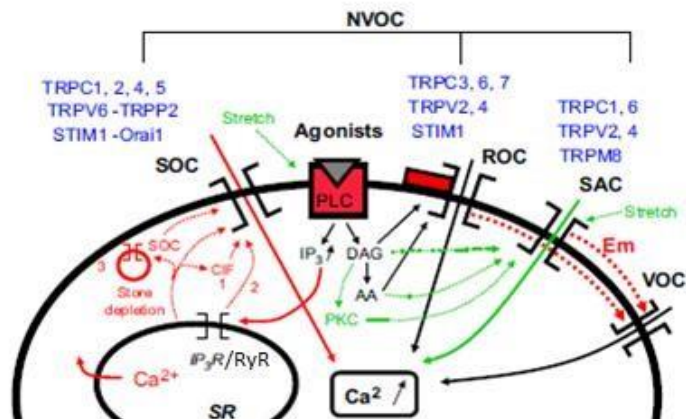


Figura 1.2. Mecanismos de entrada del Ca^{2+} al citoplasma celular. El calcio procedente del exterior celular, entra a la célula a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCs) e independientes de voltaje (SOC, ROC, SAC), mientras que el calcio que está en el retículo endoplásmico es liberado a través de los canales IP_3R y/o el RyR. TRPC: canales responsables del cambio transitorio del potencial del foto-receptor de la familia clásica, TRPV: la familia vaniloide, TRPM: la familia de la melastatina, TRPP: de la familia de la enfermedad poliquística. (Figura tomada de Guibert et al., 2008).

1.2 El retículo endoplásmico/sarcoplásmico

El principal depósito de Ca^{2+} intracelular es el retículo endoplásmico/sarcoplásmico (RE/RS), sin embargo, se ha reportado que otros orgánulos pueden actuar como compartimentos donadores o almacenadores de Ca^{2+} , entre estos se encuentran; la mitocondria, el aparato de Golgi, los lisosomas, las caveolas, gránulos de secreción y las vesículas de neurotransmisores (Pizzo et al. 2010; Patel & Muallem 2011; Aulestia et al. 2015; Plattner & Verkhatsky 2013; Isshiki et al. 2013; López-Sanjurjo et al. 2013; Verkhatsky & Petersen 1998), más adelante se describirán con detalle algunos de estos compartimentos intracelulares.

El calcio del RE/RS es liberado de este compartimento principalmente a través de dos canales: el receptor de IP_3 (1,4,5-trisfosfato de inositol) y el receptor de rianodina (RyR). (Figuras 1.1 y 1.2). El RE/RS es una red interconectada de túbulos aplanados y sáculos comunicados entre sí que intervienen en diversas funciones relacionadas con la síntesis de proteínas y su correcto plegamiento, síntesis de fosfolípidos, colesterol y hormonas esteroideas, detoxificación de drogas, así como el transporte vesicular (Somlyo & Franzini-Armstrong 1985; Voeltz et al. 2002).

El retículo sarcoplásmico (RS) constituye el principal depósito intracelular de Ca^{2+} en las células de músculo estriado y liso (Somlyo & Himpens 1989). La microscopía electrónica (EM) de células de músculo liso reveló que el RS es un sistema membranoso de túbulos y sacos, que está distribuido en toda la célula desde el núcleo hasta la periferia, y en contacto cercano con las caveolas de la membrana plasmática. También se observó que el RS está en estrecho contacto con otros orgánulos como son la mitocondria y los lisosomas (Lesh et al. 1998).

Estudios en los que se ha determinado el contenido del calcio dentro del RS de células de músculo liso, revelan una distribución no uniforme de la $[Ca^{2+}]$ total (libre más pegado a proteínas). Mientras que utilizando células de músculo liso permeabilizadas con detergente se observa una distribución de forma punteada principalmente cerca de la membrana celular y alrededor del núcleo (Steenbergen & Fay 1996; Young & Mathur 1999). También se ha demostrado que la distribución de las proteínas involucradas en la liberación y captura de Ca^{2+} no es uniforme (Lesh et al. 1998; Nixon et al. 1994). Estos datos, en su conjunto, han dado pie a sugerir que el RS está formado por sitios discretos, independientes y especializados en la liberación y captura de Ca^{2+} .

El RS puede tener la siguiente funciones en músculo liso, como se observa en la Figura 1.3: 1) contribuir a la homeostasis de Ca^{2+} en la célula, manteniendo la concentración de este ion en reposo, a través de la acción de la bomba SERCA, 2) restaurar la $[Ca^{2+}]_i$, después de la estimulación, mediante la acción de SERCA, 3) aumentar la contracción mediante la liberación de Ca^{2+} y producir o modificar las señales globales del ion en respuesta a una estimulación por agonista, 4) modular la excitabilidad de la membrana a través de la activación de canales sensibles a Ca^{2+} ; 5)

participar en la liberación vectorial del Ca^{2+} almacenado en el retículo vía la membrana plasmática; 6) contribuir al mantenimiento de micro dominios de señalización alrededor de la membrana plasmática y otros orgánulos, 7) influir en el desarrollo, envejecimiento y robustez de los tejidos del músculo liso (Wray & Burdyga 2010).

Diferentes tipos de experimentos han demostrado que la luz del RE no presenta ninguna barrera de difusión y sin embargo pareciese que el Ca^{2+} dentro del retículo está compartimentalizado. Un ejemplo de esta situación es el fenómeno conocido como liberación cuántica de Ca^{2+} que se ha explicado de diferentes maneras. Una de estas explicaciones sería que el Ca^{2+} atrapado por las proteínas lumbales del retículo se constituiría como un compartimento de Ca^{2+} que no necesariamente está en equilibrio con el Ca^{2+} libre luminal (Guerrero-Hernandez et al. 2010).

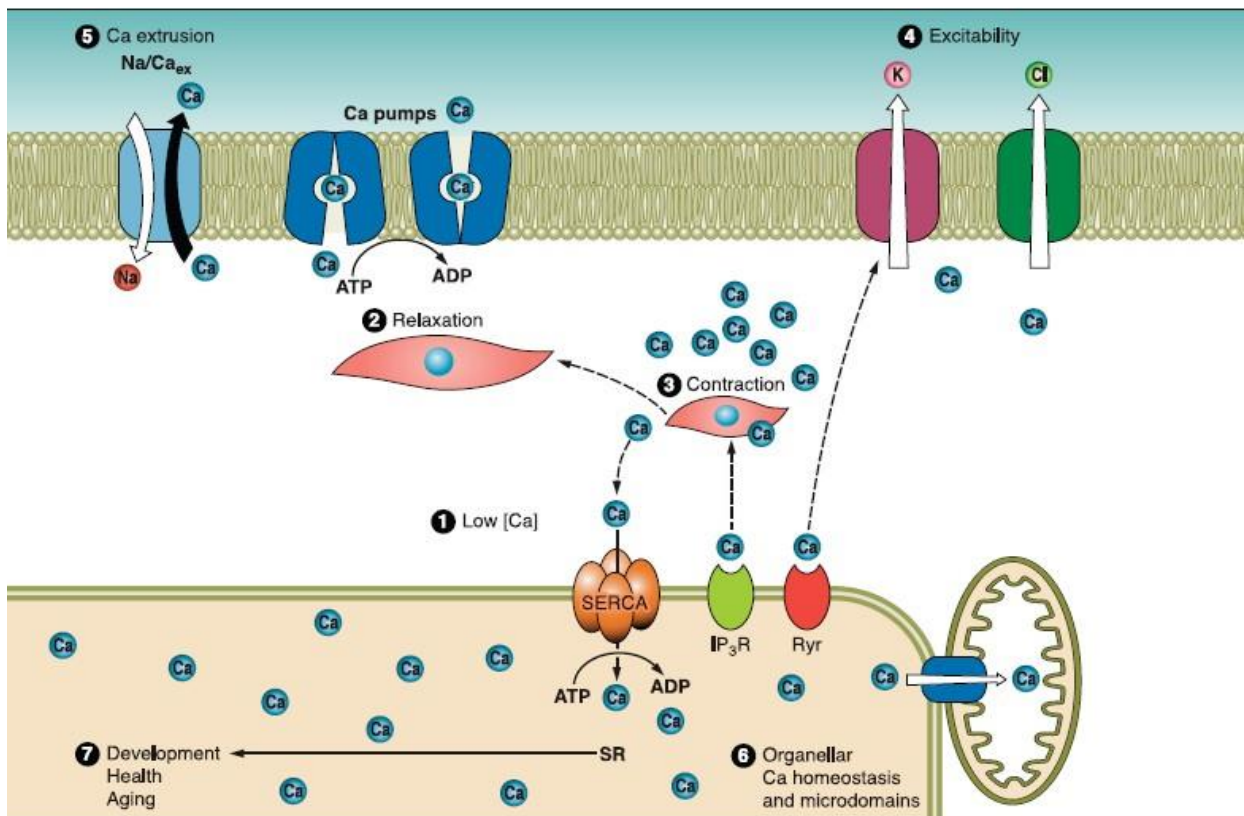


Figura 1.3. Esquema representativo de las diversas funciones del RS en músculo liso. (Figura tomada de Wray & Burdyga 2010).

1.3 Canales liberadores de calcio del RE/RS

El RS modifica la $[Ca^{2+}]_i$ de las células del músculo liso a través de los mecanismos de transporte de Ca^{2+} presentes en su membrana, es decir los canales IP_3Rs y $RyRs$ y las bombas SERCAs. Los IP_3Rs y los $RyRs$ son canales catiónicos pero permeables al Ca^{2+} que presentan cierta homología en su secuencia, principalmente en la región que forma el poro del canal, pero sin embargo son activados por mecanismos diferentes (Shah & Sowdhamini 2001; Ladenburger et al. 2009).

Los IP_3Rs responden a un incremento simultáneo tanto de la $[Ca^{2+}]_i$, como del IP_3 , éste aumenta cuando se estimulan los receptores de la membrana plasmática que están acoplados a proteínas de la familia Gq/11 (Berridge 1993). Las proteínas Gαq activadas por algunos GPCRs activan a su vez a la fosfolipasa C-β (PLC-β). La PLC-β hidroliza al 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol para generar 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) y diacilglicerol (DG) (Berridge 2016). El primero activa el RIP_3 que permite la liberación de Ca^{2+} del RS al citoplasma y el segundo activa a la PKC.

Los $RyRs$ pueden activarse a través de dos principales mecanismos, el primero es la interacción de manera directa con los VOCs, mecanismo típico del $RyR1$ que se expresa en el músculo esquelético. El segundo, es un incremento del calcio citoplásmico a través de un proceso conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR por sus siglas en inglés, calcium-induced calcium release).

En el caso de músculo liso parece ser que el mecanismo involucrado en la activación del RyR es CICR, puesto que no existe ninguna evidencia que muestre un acople directo entre el RyR y el VOC (Collier et al. 2000). Por otro lado, la activación de los IP_3Rs produce un incremento a nivel global de la $[Ca^{2+}]_i$ que conduce a la contracción, mientras que la apertura de los $RyRs$ parece estar confinada a un aumento local de la $[Ca^{2+}]_i$ (conocido como “spark”) que cuando ocurre cerca de la membrana plasmática, puede activar a los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} de conductancia grande, lo que lleva a la hiperpolarización del potencial de membrana, el cierre de los VOCs y la subsecuente relajación del músculo liso (Herrera et al. 2000; Tykocki et al. 2017).

La liberación localizada de Ca^{2+} se debe a la activación de un conglomerado de canales de liberación, ya sea los RyRs (dichas liberaciones se conocen como sparks o chispas) o los RIP_3s (cuya liberación se conocen como puffs) y que por razones que no conocemos, dichas chispas no se propagan en forma de onda de Ca^{2+} . Las chispas de Ca^{2+} en el músculo liso se pueden inducir por alguno de los siguientes factores: 1) bajas concentraciones de cafeína (0.1 mM); 2) la elevación de la concentración de Ca^{2+} causada por la entrada de éste a través de los canales de Ca^{2+} tipo L y 3) el aumento en el contenido de Ca^{2+} del RS (Borisova et al. 2007; Burdyga & Wray 2005). Estas chispas de Ca^{2+} se consideran serían las unidades básicas de liberación de Ca^{2+} y la activación coordinada de ellas produciría un incremento global de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

1.4 La bomba ATPasa de Ca^{2+} del retículo (SERCA)

La bomba SERCA participa en la remoción del Ca^{2+} citoplásmico, así como en el almacenamiento del mismo en el retículo. Su actividad permite el transporte del calcio al interior de los depósitos intracelulares en contra de su gradiente de concentración mediante el consumo directo de ATP (Lytton et al. 1992).

La bomba SERCA pertenece a la familia de enzimas conocidas como ATPasas tipo P, la cual tiene un residuo de ácido aspártico altamente conservado que es fosforilado por el ATP en respuesta a un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

La bomba está codificada por 3 genes diferentes que tienen una expresión diferencial según el tipo de tejido en cuestión: SERCA 1 es la más abundante en tejido esquelético, mientras que SERCA 2 y SERCA 3 se expresan en músculo cardiaco, liso y en tejidos no musculares. Las isoformas SERCA 1a y la 1b se expresan en los músculos esqueléticos de contracción rápida en adultos y fetales, respectivamente (Martin et al. 2002).

La bomba SERCA 2 tiene un 84% de identidad en su secuencia de aminoácidos con SERCA 1a. Por otro lado, SERCA 2b tiene un carboxilo terminal en la parte luminal que es más largo que el carboxilo de la SERCA 2a, que es citoplásmico (Verboomen et al. 1994). SERCA 2a se expresa en el corazón, en fibras de contracción lenta del

músculo esquelético, y en muchos tipos de músculos lisos. SERCA 2b parece estar presente de forma ubicua. Mientras que, SERCA 3 tiene la característica de presentar un número alto de variantes de empalme. Al menos seis variantes diferentes en humanos (SERCA 3a-f) son conocidas, tres en ratones (SERCA 3a-c) y dos en ratas (SERCA 3b-c). En todos los casos, las variantes difieren entre ellas debido a cambios en la región del carboxilo terminal (Dally et al. 2009; Brini et al. 2012).

La expresión de SERCA 3 se encuentra en diversos tipos de células de la sangre incluyendo linfocitos, plaquetas, y células madres, en células endoteliales, en epitelios del tracto intestinal o respiratorio y en las neuronas de Purkinje del cerebelo (Vandecaetsbeek et al. 2011).

Por otro lado, no pareciese que hubiese una función diferencial entre todas estas isoformas y por lo mismo no está claro porqué las células presentan tal variedad de bombas SERCA. Sólo se ha documentado diferencias en la afinidad por Ca^{2+} , donde SERCA 3 es la isoforma con la menor afinidad, con una $K_d \sim 1.1 \mu\text{M}$, mientras que la SERCA 2b tiene la mayor afinidad, con una $K_d \sim 0.27 \mu\text{M}$. La SERCA 1 y 2a tienen una afinidad intermedia con una K_d de $\sim 0.4 \mu\text{M}$, todas las isoformas tienen un coeficiente de Hill de ~ 2 y parecen tener la misma alta afinidad por el ATP ya que presentan una $K_d \sim 0.02\text{-}0.05 \mu\text{M}$ (Lytton et al. 1992; Periasamy & Kalyanasundaram 2007).

La estructura de la bomba consiste de dos partes principales, la región transmembranal la cual tiene 10 hélices alfa, y la región citoplásmica que consiste a su vez de tres dominios (la parte A, también conocida como actuador o acoplador, la parte N, porqué une el nucleótido de ATP, y la P, que contiene el residuo fosforilado). El dominio A es el que presenta el mayor número de cambios conformacionales. El dominio P contiene el residuo de ácido aspártico 351 (en la numeración de la bomba SERCA 1a), que es esencial en el ciclo catalítico y por lo mismo está fuertemente conservado (Brini et al. 2012).

La región inferior de la parte citoplásmica, o *tallo*, conecta al resto de la sección citoplásmica con la parte transmembranal. En los segmentos transmembranales M4, M5, M6 y M8 se encuentran los dos sitios de unión a Ca^{2+} . La parte luminal sólo

comprende el 5% del total de la proteína y está conformada por algunas asas que unen a los distintos segmentos transmembranales (Figura 1.4) (Toyoshima & Nomura 2002).

En la mayoría de las isoformas la estructura primaria presenta una alta homología, por lo tanto, se puede pensar que la forma y la estructura terciaria entre todas las isoformas es similar, sin embargo, la SERCA 2b y la 3b presentan una extensión de 49 a 50 aminoácidos en la región carboxi-terminal, respecto al resto de las isoformas, por lo que se ha sugerido que la región transmembranal tiene 11 segmentos en vez de 10 (Periasamy & Kalyanasundaram 2007). Lo anterior no ha sido confirmado puesto que la bomba SERCA 2b no ha sido cristalizada o su estructura revelada por criomicroscopía.

Durante el ciclo de transporte la enzima pasa por dos estados conformacionales, **E1** o de alta afinidad por Ca^{2+} citoplásmico, que está “abierto” hacia el citoplasma y es más estable en la forma desfosforilada, y **E2** o de baja afinidad por Ca^{2+} , que es más estable en la forma fosforilada y está abierto hacia la luz del RE.

En reposo la bomba permanece en la conformación de E2 y un incremento de $[Ca^{2+}]_i$ cambia su conformación a E1 para permitir la entrada y unión del ion calcio a la ATPasa (E1- Ca^{2+}). Una vez unido el calcio, ésta es capaz de unir al ATP (E1-ATP/ Ca^{2+}), después se hidroliza el ATP quedando la enzima fosforilada en el ácido aspártico (E1-P/ Ca^{2+}), en seguida se liberan los iones Ca^{2+} en el lumen reticular (E2-P). Finalmente, la enzima se desfosforila y regresa a su estado de reposo (Lytton et al. 1992). La estequiometría de la reacción es de 2 moles de Ca^{2+} por 1 mol de ATP, y el intercambio por 2 ó 3 H^+ (Figura 1.4) (Toyoshima & Nomura 2002).

Además del Ca^{2+} existen pequeñas proteínas que modulan la actividad de SERCA, entre ellas están la fosfolamban (PLN), la sarcolipina (SLN), un péptido recientemente identificado llamado mioregulina (MLN) y un ARN no codificante específico del músculo que codifica un péptido de 34 aminoácidos que es nombrado DWORF por sus siglas en inglés (Dwarf Open Reading Frame) (Periasamy et al. 2017; Benjamin et al. 2016).

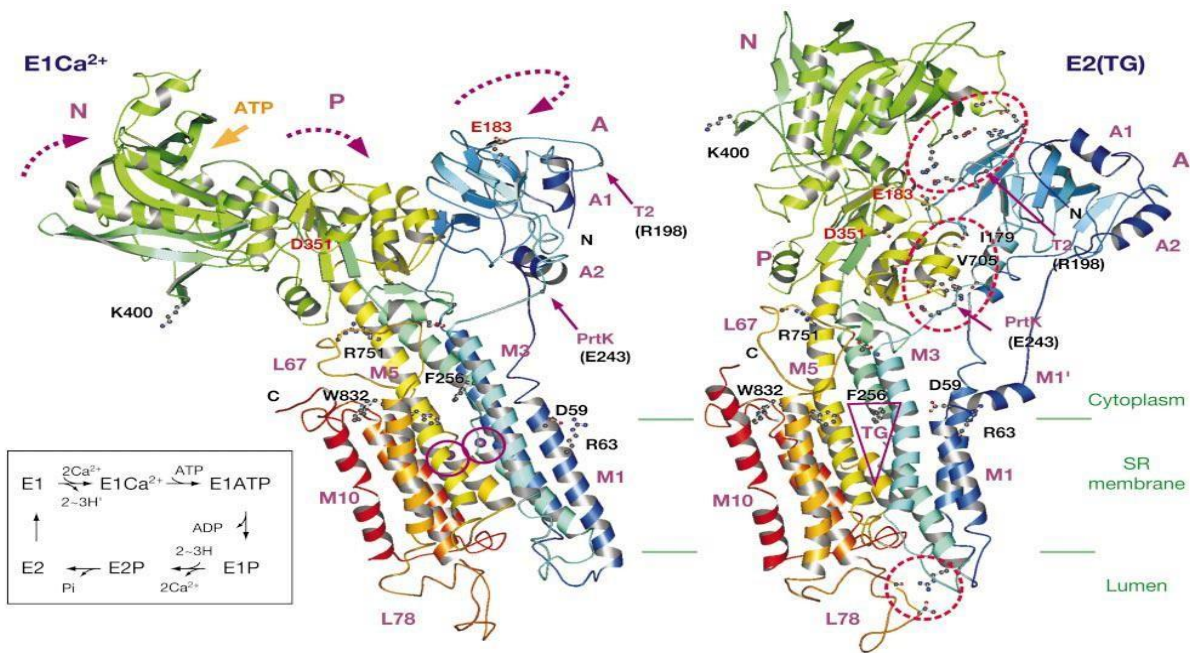


Figura 1.4 Representación en listones de la estructura cristalina de la bomba SERCA en dos de sus múltiples conformaciones. E1- Ca^{2+} es la forma de alta afinidad por Ca^{2+} citoplásmico y E2 (TG) es la forma de baja afinidad por Ca^{2+} estabilizada por la presencia de tapsigargina. El recuadro muestra el ciclo catalítico que ha sido verificado mediante la cristalización de las diferentes conformaciones especificadas. Los colores cambian gradualmente desde el extremo amino-terminal en azul hasta el extremo carboxilo en rojo. Se observan los sitios de unión a calcio en círculos de color púrpura y el triángulo púrpura indica la posición en donde se une la tapsigargina (TG) que rigidiza a la bomba y la inhibe por impedir que lleve a cabo los cambios conformacionales asociados con el ciclo catalítico. (Figura tomada de Toyoshima et al., 2002).

La proteína PLN es transmembranal e interacciona con la SERCA 1a, SERCA 2a y 2b, pero no con SERCA 3. Esta interacción impide que la ATPasa cycle entre sus diferentes estados conformacionales, lo que resulta en su inhibición. La fosforilación de fosfolamban impide la interacción de esta proteína con SERCA, evitando así su efecto inhibitorio lo cual lleva a un incremento en la actividad de la bomba SERCA y por ende del contenido de calcio en el RS (Brini et al. 2012). Sarcolipina (SLN) es una pequeña proteína, compuesta de 31 aminoácidos, y está principalmente expresada en músculo estriado. Se cree que SLN podría ser homóloga al PLN y que regula la actividad de SERCA1 en los músculos esqueléticos. La coexpresión de SLN y PLN en células HEK-293 produce la super inhibición de la bomba. La importancia fisiológica de la regulación de la bomba SERCA por SLN aún no se conoce (MacLennan et al. 2003).

MLN es un micropéptido de 46 aminoácidos que forma una sola hélice alfa transmembrana que interactúa con SERCA en la membrana del RS y regula el transporte de Ca^{2+} . La eliminación de MLN en ratones transgénicos mejora significativamente la liberación de Ca^{2+} y aumenta el rendimiento ante el ejercicio físico. Estos hallazgos identifican a MLN como el inhibidor de SERCA predominante en el músculo esquelético, que sorprendentemente está codificado por un ARN que se había considerado de los no codificantes (Periasamy et al. 2017). Recientemente, otro péptido de 34 aminoácidos se identificó a partir de un ARN putativo no codificante largo y específico de músculo, el cual se denominó DWORF. Los estudios de manipulación genética sugirieron que DWORF mejora la actividad de la bomba SERCA y aumenta la contractilidad muscular en corazón (Benjamin et al. 2016). El mecanismo detallado de la interacción de MLN y DWORF con SERCA está actualmente en investigación.

Existen diferentes fármacos que pueden inhibir a la bomba SERCA con diferentes grados de potencia. Inicialmente, los inhibidores se utilizaron para ayudar a dilucidar los detalles mecánicos y cinéticos de la bomba SERCA, sin embargo, recientemente, estos inhibidores han permitido estabilizar las distintas estructuras conformacionales de la bomba SERCA para observarlas usando cristalografía de rayos X de los complejos SERCA-inhibidor.

Algunos inhibidores tales como tapsigargina, BHQ (2,5 Di-t-butil-1,4- hidroquinona) y CPA (ácido ciclopiazónico), son los más utilizados debido a su especificidad, lo cual también ha permitido su uso extendido en el campo de la señalización celular.

Tapsigargina (TG) es el inhibidor más popular, se identificó a partir de un extracto de la planta *Thapsia garganica* que aumentaba la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en plaquetas que estaban en ausencia de Ca^{2+} externo. Posteriormente se observó que este efecto se debía a la inhibición de la bomba SERCA. Este inhibidor es una lactona sesquiterpeno que inhibe a la bomba SERCA en el rango de concentración de nanomolar de forma prácticamente irreversible pues se asocia fuertemente a la fenilalanina 256 (numeración de la SERCA 1A). Además la tapsigargina es muy selectiva puesto que no inhibe otras bombas de calcio como serían las PMCAs o las SPCAs (Michelangeli & East 2011).

Aunque TG inhibe a las tres isoformas de la bomba SERCA, no lo hace con la misma potencia, siendo 60 veces más potente para SERCA 1 que para SERCA 3 (valores de K_i de 0.2 nM, 1 y 12 nM para las isoformas de SERCA 1, 2 y 3, respectivamente) (Wootton & Michelangeli 2006). Se sabe que la TG estabiliza a la bomba en la configuración E2 (de baja afinidad a Ca^{2+}) con una constante cinética de disociación muy lenta, haciendo que su efecto inhibitorio sea muy difícil de revertir.

Otros inhibidores son el BHQ y el CPA que, al igual que la TG, se han utilizado también como herramientas farmacológicas para inhibir a la bomba SERCA, y ahora sabemos que esto se debe a que inmovilizan la bomba en la conformación E2. Originalmente se propuso que estos inhibidores se unían en el mismo sitio que la TG, pero estudios de cristalografía han mostrado que BHQ se une en el lado opuesto al de la TG (Michelangeli & East 2011). El ácido ciclopiazónico (CPA) es un metabolito secundario de hongos, químicamente tóxico, aislado de diferentes tipos de hongos, parecido a la tapsigargina. CPA específicamente se une e inhibe a la bomba SERCA con una afinidad en el orden de nanomolar. Originalmente se propuso que CPA y TG se unían en sitios similares de SERCA, pero estructuras cristalinas recientes han mostrado que tienen diferentes sitios de interacción (Laursen et al. 2009).

1.5 El Receptor de Rianodina

El RyR es una proteína tetramérica con un peso molecular aproximado de 2 MDa insertada en la membrana del RS con un poro conductor de Ca^{2+} , con tres diferentes isoformas. Las cuales son RyR-1, predominante en músculo esquelético, pero también parece estar expresada a niveles bajos en músculo cardíaco, músculo liso, estómago, riñón, cerebelo, células de Purkinje, glándulas adrenales, ovarios y testículos. El RyR-2 se encuentra principalmente en músculo cardíaco, en neuronas de Purkinje y de cerebelo, y en bajos niveles en estómago, riñón, glándulas adrenales, ovario y timo. Por último, la isoforma 3 que está expresada en neuronas, en tálamo, músculo esquelético y músculo liso (Lanner et al. 2010).

Por lo tanto, es muy interesante que en una misma célula de músculo liso se expresen las 3 isoformas del RyR, aunque muestran una distribución diferencial dentro del RS (X. R. Yang et al. 2005; Clark et al. 2010; Vaithianathan et al. 2010). La estructura primaria de las 3 isoformas del receptor se dedujo a partir de estudios de clonación y secuenciación del cDNA (George et al. 2005). Cada subunidad que forma el canal tiene aproximadamente 5,000 aminoácidos y el porcentaje de homología, entre las diferentes isoformas, es aproximadamente del 65 %.

En cuanto a la estructura tridimensional de este canal se ha determinado, con criomicroscopía de alta resolución, la estructura del RyR1 de conejo y mamífero (Yan et al. 2015; Zalk et al. 2015; Efremov et al. 2015), mientras que el RyR2 sólo se ha resuelto en asociación con la proteína reguladora FKBP12.6 en el estado cerrado (Dhindwal et al. 2017), con respecto al RyR3 aún no se ha publicado nada sobre su estructura.

La molécula presenta dos regiones principales, un dominio citoplásmico y un dominio transmembranal. Las regiones del amino terminal y central de la molécula son las que constituyen el dominio citoplásmico; mientras que la región del carboxilo-terminal es la que forma el dominio transmembranal y por lo mismo aquí se encuentra el poro del canal (Zalk et al. 2015).

Todas las isoformas de los RyRs adoptan una estructura similar a un hongo simétrico cuádruple, con seis hélices transmembrana (S1-S6) por protómero que rodea el poro central (Zalk et al. 2015; Peng et al. 2016) (Figura 1.5). En las esquinas exteriores extremas del tetrámero hay tres dominios SPRY (denominados así porque fueron identificados tanto en la tirosina cinasa de *Dictyostelium discoideum* como en las tres isoformas del RyR). Los residuos de glicina en las hélices de revestimiento del poro pueden funcionar como "bisagras" para facilitar la orientación de la extensión citoplásmica de S6 con el fin de modular la apertura del canal. De acuerdo con el 70% de similitud de secuencia, la arquitectura general y la organización del dominio de RyR2 son idénticas a las de RyR1 (Yan et al. 2015; Peng et al. 2016) (Figura 1.5). Además, curiosamente, el residuo Gly4934 se conserva en todas las isoformas del RyR y en el IP₃R (Santulli & Marks 2015).

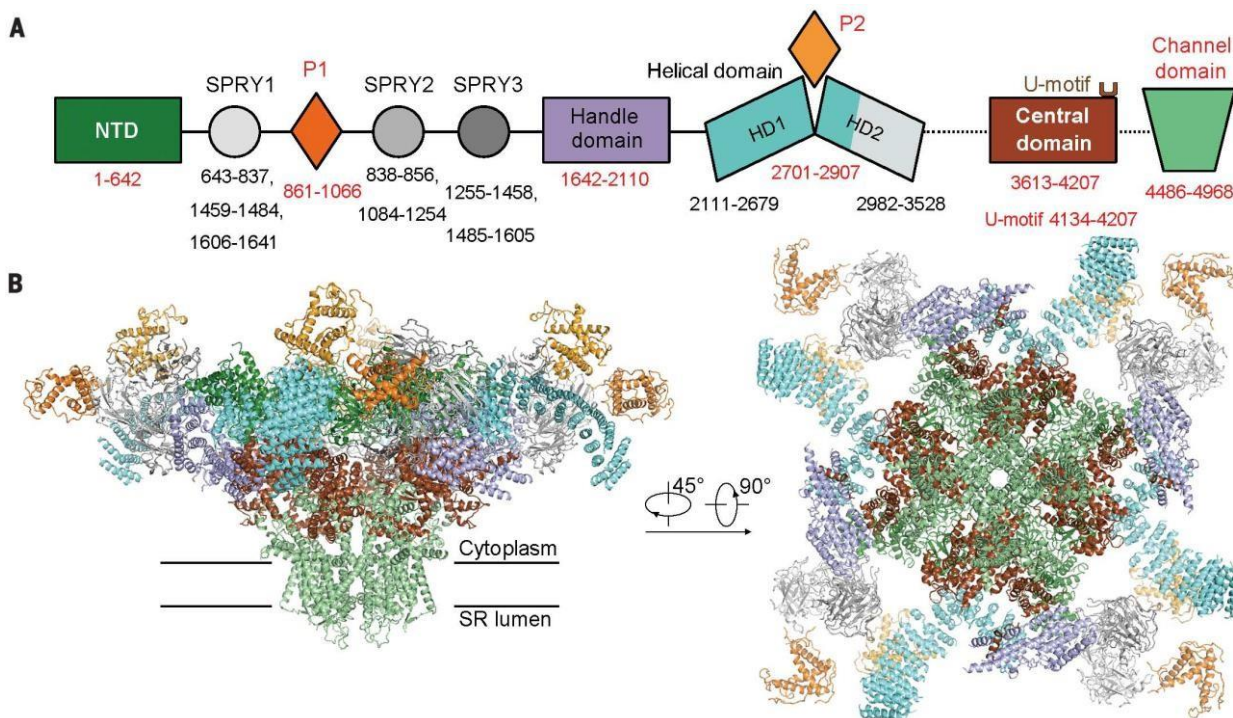


Figura 1.5 Estructura del RyR2 de corazón porcino (pRyR2) determinado por criomicroscopía electrónica, con una resolución de 4.2 Å. (A) Organización de los dominios de un protómero del pRyR2. En cada dominio se indican los límites, con los límites asignados de manera confiable marcados en rojo. (B) Estructura general del pRyR2 cerrado. La estructura tetramérica presenta el mismo código de color que en A. (Figura tomada de Peng et al., 2016).

El Ca^{2+} es el principal agonista fisiológico del RyR, sin embargo, existen diversos ligandos fisiológicos como el Mg^{2+} , el ATP o la ADP ribosa cíclica (cADPR por sus siglas en inglés), sustancias exógenas como cafeína, rojo de rutenio, tetracaína y la rianodina, o procesos celulares tales como la fosforilación y la oxidación, que pueden modular o activar al RyR (Sutko et al. 1997). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tiene un efecto bifásico en la actividad de este canal, a concentraciones bajas (1-10 μM) activan al RyR, mientras que concentraciones altas (1-10 mM) lo inhiben (Lanner et al. 2010). El $[\text{Ca}^{2+}]_L$ también modula la actividad del RyR, el incremento del Ca^{2+} en el RS aumenta la probabilidad de apertura del RyR, al incrementar la sensibilidad del canal a la activación y reducir su sensibilidad a la inactivación por Ca^{2+} (Laver 2007).

El efecto de la concentración del Ca^{2+} del RE, en la actividad del RyR parecer ser resultado de una interacción directa del Ca^{2+} con sitios de activación e inactivación presentes en el lado luminal del canal (Györke & Györke 1998; Ching et al. 2000). Sin embargo, también es posible que algunos de estos efectos sean mediados, al menos en

parte, por proteínas lumbinales asociadas al RyR, como calsecuestrina o el dímero de triadina-junctina (Györke et al. 2004; Lanner et al. 2010).

En óvulos de erizo de mar, se observó por primera vez que la cADPR inducía la liberación de Ca^{2+} vía el RyR (Galione et. al., 1991), después se reportó que estimula la liberación de Ca^{2+} de los RyRs presentes en diversos tejidos, incluyendo las células de músculo cardíaco (Mészáros et al. 1993), células del cerebro, células β pancreáticas, entre otras (Galione & Chuang 2012). Este compuesto se piensa que es un segundo mensajero intracelular, al igual que el IP_3 y es sintetizado por una familia de enzimas llamadas ADP-ribosil ciclasas, las cuales usan nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD^+) como sustrato. El mecanismo exacto por el cual la cADPR regula la actividad de los RyRs no está bien definido. Sin embargo, se ha sugerido, un papel fundamental de proteínas accesorias que interaccionan con el dominio citoplásmico de las subunidades del RyR puesto que la cADPR no se une directamente al RyR (Lee 2011).

Por otro lado, los compuestos farmacológicos que se han utilizado principalmente para caracterizar al RyR son la cafeína y la rianodina. La cafeína es un activador exógeno del RyR más utilizado, esta sustancia incrementa la probabilidad de apertura del canal, sin modificar su conductancia, basándonos en los registros hechos en bicapas lipídicas planas (Rousseau & Meissner 1989), su efecto es un corrimiento de la curva de activación por calcio a concentraciones menores (Meissner et al. 1997). En fibras musculares lisas, la cafeína produce un incremento transitorio y global de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ como resultado del cambio en la probabilidad apertura de los RyRs, esto último favorece la activación coordinada de un mayor número de canales (Ganitkevich & Isenberg 1992).

En términos de su acción farmacológica en el RyR, la cafeína es una clase de segundo activador como son el Ca^{2+} y los nucleótidos de adenina (Zucchi & Ronca-Testoni 1997), todos ellos actúan aumentando la probabilidad de apertura del RyR, sin alterar su conductancia, por ello se ha propuesto que sus sitios de unión son distintos pero que interactúan sinérgicamente (Pessah et al. 1987). El sitio putativo de unión a la cafeína ha sido identificado recientemente y está en la interfaz de los dominios CTD

(por sus siglas en ingles C-terminal domain), S2S3 y TaF (por las siglas en ingles thumb and Forefingers domain) (Figura 1.6). La colocación de los sitios de unión de ATP, cafeína y Ca^{2+} en las interfaces de la CTD con otros dominios del canal destaca la importancia de la región CTD en la activación del canal (des Georges et al. 2016).

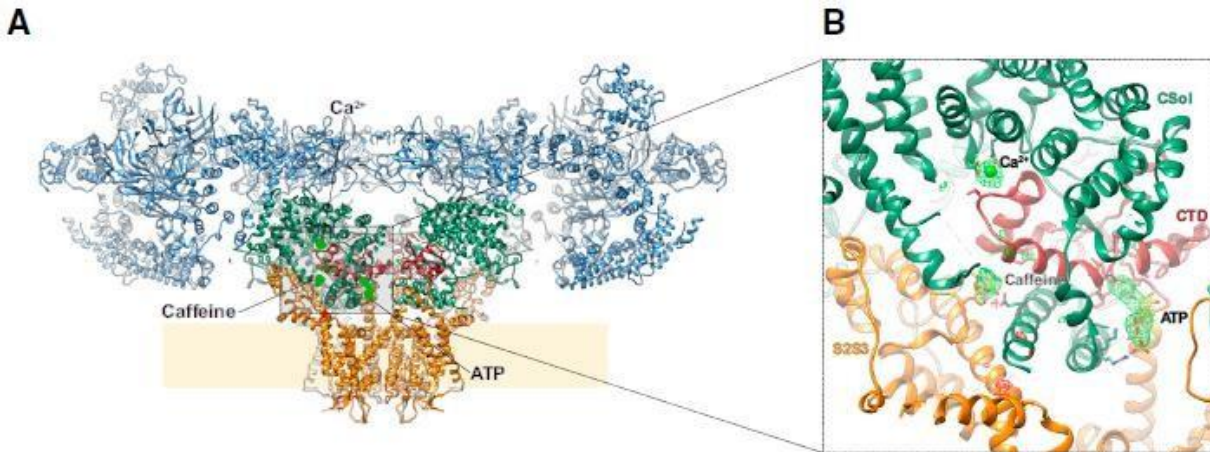


Figura 1.6 Sitio de unión a cafeína del RyR1. A) La arquitectura de RyR1 se representa en listones, la región citoplásmica (residuos 1-3666) de color azul, el núcleo solenoide (residuos 3667-4253) en verde oscuro, la región transmembrana y S6c (residuos 4540-4956) en naranja, y el CTD (residuos 4957 - 5037) de color rojo oscuro. Se muestran los sitios putativos de unión a Ca^{2+} , ATP, y cafeína. B) Vista agrandada de la inserción en (A), con los ligandos y residuos que interactúan con el RyR1. (Figura tomada de des Georges et. al., 2016).

La rianodina se une al RyR con alta afinidad y selectividad, puesto que reconoce su conformación abierta y muestra una velocidad de disociación muy lenta (del orden de horas) (Pessah & Zimanyi 1991). Esta característica de la interacción de rianodina con la conformación abierta del RyR nos permite utilizar a esta sustancia como un indicador del estado abierto del canal. El efecto de la rianodina en el RyR depende de la concentración; así tenemos que a concentraciones bajas, de ~ 10 nM, la rianodina aumenta la probabilidad de apertura del canal, a concentraciones intermedias ~ 1 μM , deja al canal en un estado de subconductancia y de alta probabilidad de apertura, y a concentraciones altas ~ 100 μM , lo bloquea (Buck et al. 1992; Thomas & Williams 2012).

Se ha demostrado que la rianodina presenta sitios de baja afinidad con su receptor, en algunos estudios la relación entre los sitios de alta y baja afinidad, es cercano a tres, esto es consistente con un modelo de canal tetrámero del RyR, sin embargo, en otros reportes esta relación es sustancialmente mayor, en el rango de 10 a 100 (Pessah & Zimanyi 1991; Buck et al. 1992). Estos autores sugieren que la unión de

alta y baja afinidad involucra sitios diferentes y que el sitio de baja afinidad no es exclusivo del RyR, sino que también está afectado por las proteínas que tiene asociadas.

La localización molecular del sitio de unión de la rianodina parece estar en el poro del canal. Esta región contiene varias hélices transmembranales, algunas de las cuales contribuyen a la formación del poro del canal. Con la alta resolución de la estructura tridimensional del RyR1 se determinó un sitio de unión putativo a rianodina dentro de la región del poro, que es directamente adyacente a Q4933 (des Georges et al. 2016) (Figura 1.7), cuya mutación reduce específicamente la unión de rianodina sin afectar la función de canal (Fessenden et al. 2001; Ranatunga et al. 2007).

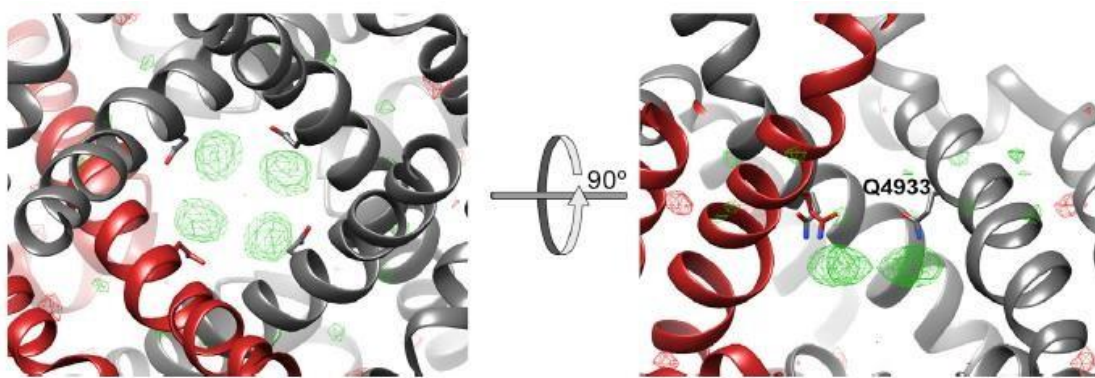


Figura 1.7 Sitio de unión a rianodina. Diferencia entre la reconstrucción del poro abierto activado con Ca^{2+} /ATP/cafeína y la reconstrucción de poro abierto bloqueado con $10 \mu\text{M}$ rianodina, (cintas grises y un protómero de color rojo oscuro) y mostradas en dos orientaciones (izquierda, vista desde el citosol, derecha, paralela a la membrana). El mapa de diferencias se representa como una malla verde/roja y contorneada a 5σ . Q4933 se representa en barras. (Figura tomada de des Georges et. al., 2016).

La unión de la rianodina a este sitio bloquea el poro transmembranal en un estado dilatado. La estructura del RyR1 modificado tiene varias implicaciones para la comprensión del mecanismo de la modulación del RyR y de su actividad como canal. Los cuatro sitios de unión a rianodina equivalentes dentro del poro están suficientemente cerca uno del otro y probablemente la asociación de una molécula de rianodina a cualquiera de ellos afectaría negativamente la unión de esta molécula en los tres sitios restantes, consistente con la observación de que la rianodina se une a un único sitio con alta afinidad, seguida de una asociación lenta en sitios de afinidad más baja. Cabe destacar que, el residuo equivalente en el IP_3R , que tiene un poro transmembrana similar pero que no responde a la rianodina, es una fenilalanina.

1.6 Otros depósitos de Calcio

Como antes se mencionó, el depósito intracelular mejor caracterizado y conocido con la capacidad de acumular y liberar Ca^{2+} es el RE/RS; sin embargo, existen otros compartimentos vesiculares que son conocidos por acumular Ca^{2+} (el aparato de Golgi, gránulos secretores, endolisosomas, lisosomas, caveolas y/o vesículas endocíticas) y son capaces de liberarlo bajo condiciones particulares (Rizzuto & Pozzan 2006). Cabe mencionar que, los mecanismos de homeostasis del Ca^{2+} en estos orgánulos, se han estudiado en menor grado con respecto al RS y, en consecuencia, la mayoría de las conclusiones se basan en pruebas indirectas o se deben a mera especulación.

Si bien las características de las vesículas endocíticas han sido estudiadas desde muchos puntos de vista, la literatura sobre el manejo de Ca^{2+} por estas vesículas es escasa, conociéndose lo siguiente; las vesículas ácidas actúan como fuentes de Ca^{2+} para regular diversos procesos río abajo: por ejemplo, el Ca^{2+} endolisosomal regula la excitabilidad de la membrana plasmática, la diferenciación celular y desencadena señales globales de Ca^{2+} mediante el reclutamiento del RE, entre otros (Morgan et al. 2015). El mecanismo preciso de captación de Ca^{2+} en los depósitos ácidos de mamíferos es desconocido, pero se ha sugerido que podría ser semejante a las vesículas ácidas de plantas y levaduras (vacuolas) (Pittman 2011), donde la captura de Ca^{2+} depende del gradiente de protones (H^+) y, por lo tanto, se ha propuesto la presencia de una forma de intercambio neto $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, en lugar de un proceso mediado por SERCA (Figura 1.8) (Morgan et al. 2015).

Al igual que el RE, las reservas de Ca^{2+} ácidas tienen canales que liberan este ion hacia el citoplasma y por ende pudieran participar en la señalización de Ca^{2+} . Estos canales incluyen miembros de la familia de canales responsables del potencial transitorio del fotorreceptor ((TRP) los canales mejor caracterizados en orgánulos ácidos son los TRPMLs (mucolipinas), los canales de dos poros (TPCs), los receptores ionotrópicos activados por ATP (P2X), los RIP_3 y los RyRs (Patel & Cai 2015).

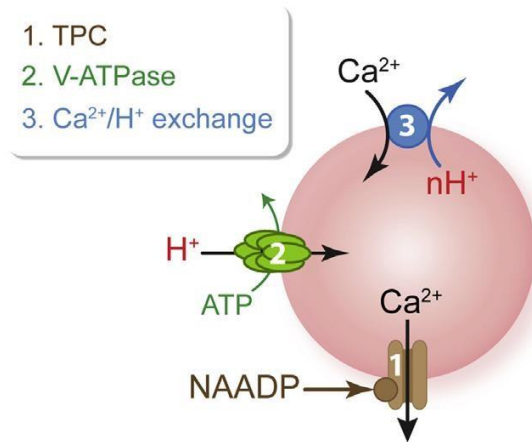


Figura 1.8 Esquema de la homeostasis del H⁺ y del Ca²⁺ en una vesícula ácida. La ATPasa vacuolar bombea H⁺ y acidifica el lumen del orgánulo. El Ca²⁺ es transportado al interior del lumen por la energía del gradiente de H⁺ en alguna versión del intercambiador Ca²⁺/H⁺ (este intercambiador no se conoce en las células de los mamíferos, por lo que se sugiere que podría ser el resultado neto de dos reacciones: el intercambio Na⁺/H⁺ y Na⁺/Ca²⁺). El Ca²⁺ se puede liberar a través de canales permeables a Ca²⁺ tales como el canal de dos poros (TPC) activado por NAADP, el TRPML1 u otros, aunque esto aún está en controversia. (Figura tomada de Morgan et. al., 2015).

Por otra parte, en el óvulo de erizo de mar se registró, por primera vez, la acción liberadora de Ca²⁺ del NAADP de una región diferente al RE, puesto que se involucró un depósito ácido, probablemente un orgánulo lisosomal (Galione et al. 2000). A pesar de la separación física de los almacenes de Ca²⁺ sensibles a NAADP del RE, se considera que los dos están funcionalmente acoplados en células intactas. Por lo tanto, se ha propuesto que el NAADP proporciona una "desencadenante" liberación de Ca²⁺, que luego se amplifica por los canales de liberación de Ca²⁺ presentes en el RE (Churchill et al., 2002). En células de mamíferos, también se cree que el NAADP libera Ca²⁺, aunque esta idea es un poco controversial, ya que las señales de calcio en las células de mamíferos a menudo no son observables después del bloqueo/agotamiento del RE (Galione & Petersen 2005).

Las plaquetas, al igual que los óvulos de erizo de mar, poseen diferentes tipos de orgánulos ácidos entre los que se incluyen a los gránulos densos, así como a los lisosomas. Se ha reportado que el NAADP es capaz de movilizar Ca²⁺ desde los compartimentos ácidos de las plaquetas (López et al. 2006). También se ha demostrado que la captación de Ca²⁺ por los compartimentos ácidos, depende de una bomba de

Ca^{2+} que es sensible a TBHQ pero que presenta una baja sensibilidad a tapsigargina, por lo que se ha propuesto que la captación de Ca^{2+} estaría mediada por SERCA 3 (López et al. 2005).

Aunque a menudo agrupados bajo la clasificación de depósitos ácidos, los gránulos de secreción son muy diferentes entre los distintos tipos de células y, por lo mismo, no es sorprendente que los mecanismos por los que captan Ca^{2+} del citoplasma sean heterogéneos. A la fecha se cuenta con algo de información acerca de los gránulos de insulina, y con estudios indirectos para otros compartimentos secretores tales como serían los gránulos de zimógeno, los gránulos de cromafina y las vesículas sinápticas. En cuanto a los gránulos de insulina, estudios detallados utilizando aequorina localizada exclusivamente en estos gránulos revelaron que el Ca^{2+} se acumula vía una ATPasa sensible a Ca^{2+} y a vanadato, posiblemente la SPCA. De acuerdo con estos estudios, aunque el lumen de los gránulos es notoriamente ácido, el gradiente de H^+ no juega ningún papel en la acumulación de Ca^{2+} , además de que la captación de este ion no se vio reducida por el inhibidor de la bomba de protones, la bafilomicina (Mitchell et al. 2001).

En cuanto a los gránulos de zimógeno, el mecanismo involucrado en la acumulación de Ca^{2+} no se ha investigado con gran detalle, pero se ha demostrado que no depende de una SERCA sensible a tapsigargina (Gerasimenko et al. 1996). En cuanto a gránulos de cromafina y vesículas sinápticas, el consenso general, es que se cargan con Ca^{2+} por la acción de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Fitzpatrick & Waisman 1996).

Respecto a los lisosomas, hay que destacar que, además de ser orgánulos de almacén de Ca^{2+} , pueden comportarse también como, vesículas secretoras de este ion. El mecanismo para su carga con Ca^{2+} aún no está definido, pero está claro que no depende de la bomba SERCA (Rodríguez et al. 1997) pero que involucra un mecanismo molecular que es sensible a la bafilomicina y por lo tanto requiere un gradiente de protones (Xu et al. 2012).

Los lisosomas y otros depósitos ácidos, como los que se mencionaron anteriormente, están surgiendo como orgánulos multifuncionales que cumplen una serie de funciones importantes en la célula (Saftig & Klumperman 2009), incluyendo la generación y modulación de las señales de Ca^{2+} citoplásmico. Aunque se pensaba que la función de estos compartimentos era la de aceptores terminales de las cargas autofágicas y/o endosomales, sin embargo; además de esta función ahora hay evidencia que indica que los lisosomas son orgánulos capaces de liberar y amortiguar Ca^{2+} citoplásmico (Morgan et al. 2011; Galione et al. 2011).

La capacidad de almacenamiento de Ca^{2+} de los depósitos endo-lisosomales parece ser menor, en comparación con el RE, sin embargo, los depósitos ácidos pueden modificar la señalización por Ca^{2+} de varias formas, la cuales dependen críticamente de la localización celular de los compartimentos ácidos. La liberación local de Ca^{2+} por lisosomas hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática, se ha observado mediante el uso de proteínas reportero de Ca^{2+} que se expresan en el interior de los lisosomas (Shen et al. 2012; McCue et al. 2013).

Se ha demostrado que las balsas lipídicas son un grupo de señalización muy complejo; y varios de los reguladores y canales iónicos implicados en la señalización de Ca^{2+} se han encontrado en los dominios de las balsas lipídicas (Isshiki & Anderson 1999) lo que sugiere que estos dominios tienen un papel importante en la modulación de la señalización de Ca^{2+} . Además, investigaciones recientes han demostrado la asociación de los canales de potencial transitorio del fotorreceptor del tipo clásicos (TRPCs) con microdominios de caveolas (Brazer et al. 2003; Souza & Ambudkar 2014).

Reporteros de Ca^{2+} dirigidos a la cara citoplásmica de la membrana plasmática o de las caveolas mostraron que los niveles de Ca^{2+} son más altos en el citoplasma cercano a las caveolas, que en el citoplasma asociado al resto de la membrana plasmática y mucho mayor que en el resto del citoplasma (Isshiki et al. 2002). Posteriormente, usando la misma sonda de Ca^{2+} adherida a la cara citoplásmica de las caveolas, Isshiki et al. demostraron que en condiciones de reposo hay regiones no homogéneas de alto nivel de Ca^{2+} a lo largo del borde de la membrana plasmática (Isshiki et al. 2004). Estos datos sugieren que las caveolas son regiones de la

membrana plasmática especializadas en la entrada de Ca^{2+} del medio externo y que la remoción de Ca^{2+} citoplásmico sucede en regiones diferentes a las caveolas.

El mismo grupo de Isshiki usaron un indicador de Ca^{2+} que ve a la luz de los endosomas (utilizando la secuencia del receptor a lipoproteínas de baja densidad) demostraron que la activación con ATP de receptores purinérgicos ubicados en la membrana plasmática, pueden liberar Ca^{2+} de estos compartimentos que se cree que son caveolas. Este Ca^{2+} local intracelular puede contribuir a la organización compleja y espacio-temporal de la señalización por Ca^{2+} , aumentando la versatilidad de las funciones endoteliales y de esa forma evitando el vaciamiento de Ca^{2+} del RE (Isshiki et al. 2013).

Con respecto al aparato de Golgi, éste es bien conocido por ser altamente heterogéneo en términos de morfología, composición de proteínas y sus funciones. Del mismo modo heterogéneo parecen ser sus mecanismos de manipulación de Ca^{2+} . De hecho, la captación de Ca^{2+} en el cis-Golgi e intermedio está mediada por las bombas SERCA del RE/RS, mientras que en el trans-Golgi es mediada por el homólogo de PMR1, una ATPasa capaz de transportar calcio y manganeso, que se identificó inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Pizzo et al. 2011; Pizzo et al. 2010).

En cuanto a su función, estas ATPasas son diferentes a las SERCAS en tres aspectos principales: 1) transportan igualmente tanto Ca^{2+} como Mn^{2+} , 2) no son afectadas por los inhibidores de la bomba SERCA y 3) se encuentran en las cisternas del Golgi (donde conviven con SERCAS en la región cis de Golgi), en el trans-Golgi y en las vesículas secretoras (Rizzuto & Pozzan 2006). Debido a esta última propiedad, las bombas ahora se conocen como SPCA (ATPasa de calcio de las vías secretoras, por sus siglas en inglés). Por otra parte, un nuevo depósito de Ca^{2+} de naturaleza citológica no bien definida, ha sido identificado funcionalmente hace unos años y se observa en diferentes tipos celulares. Estos compartimentos no utilizan la bomba SERCA para almacenar el Ca^{2+} y se cargan sólo cuando se incrementa masivamente y por periodos prolongados de tiempo, el nivel de calcio citosólico (Pizzo et al. 1997).

2. ANTECEDENTES

Los cambios en el nivel de calcio tanto citoplásmico como luminal del RS, y el efecto de agonistas de los canales liberadores de calcio del RS y de los inhibidores de la bomba SERCA, no se ha medido simultáneamente y mucho menos con resolución subcelular en células de músculo liso. Al respecto, uno de los enfoques para la medición de calcio luminal en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} del músculo liso es el uso de indicadores orgánicos de calcio de baja afinidad, tal como el Mag-fluo-4.

Originalmente, este enfoque se utilizó para medir los cambios del $[\text{Ca}^{2+}]_L$ en las células epiteliales gástricas. Posteriormente, la técnica se aplicó a diferentes tipos de células incluyendo músculo liso y se modificó para permitir la medición simultánea de calcio citosólico y luminal en hepatocitos, en células del estómago de sapo y células de músculo liso uterino de rata (Shmigol et al. 2001a).

Como se mencionó anteriormente, el depósito de calcio mejor estudiado es el RS con su complemento definido de bombas de Ca^{2+} , proteínas amortiguadoras y canales de liberación de Ca^{2+} . Pero ahora sabemos que hay otros orgánulos tales como las mitocondrias y una variedad de compartimientos “ácidos” que también pueden secuestrar y liberar Ca^{2+} .

En trabajos anteriores desarrollados en el laboratorio se observó que la preincubación de las células de músculo liso con 100 nM de tapsigargina o la aplicación de un pulso corto de 5 s de 10 μM del inhibidor de la bomba SERCA, produce una inhibición de la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por cafeína, sugiriendo que hay un vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , o que el depósito que aporta el Ca^{2+} al citoplasma está relleno únicamente por una bomba SERCA sensible a tapsigargina (Figura 2.1B) (Gómez-Viquez et al. 2005).

La preincubación de las células con 10 μM de rianodina, un alcaloide que se une específicamente al RyR, resultó en la completa inhibición del transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en

respuesta a un segundo pulso de cafeína. Ya que la rianodina puede producir un estado subconductante con alta probabilidad de apertura en el RyR, lo cual se podría traducir

en el completo vaciamiento de los depósitos intracelulares que contienen a este canal sensible a rianodina y activado por cafeína y por lo mismo, el depósito intracelular de Ca^{2+} no se habría podido recuperar y esto explicaría la inhibición por rianodina de la segunda respuesta a cafeína (Figura 2.1A) (Gómez-Viquez et al. 2005).

Como se mencionó en la introducción, una misma célula de músculo liso expresa las tres isoformas de los RyRs, aunque estos no están homogéneamente distribuidos. La rianodina fluorescente ha mostrado que los RyR pueden estar presentes en tres regiones subcelulares diferentes, es decir, en las regiones perinuclear, citoplasmática y superficial (Figura 2.2A) (Gómez-Viquez et al. 2010). Esta misma distribución fue observada en otros tipos de células de músculo liso usando anticuerpos específicos para cada isoforma y se mostró que el RyR3 se encuentra principalmente en la región perinuclear, la región citoplasmática expresa RyR2 y la superficie de la célula está enriquecida con RyR1 (Clark et al. 2010; X. R. Yang et al. 2005; Nicholas P. Kinnear et al. 2008; Gilbert et al. 2014).

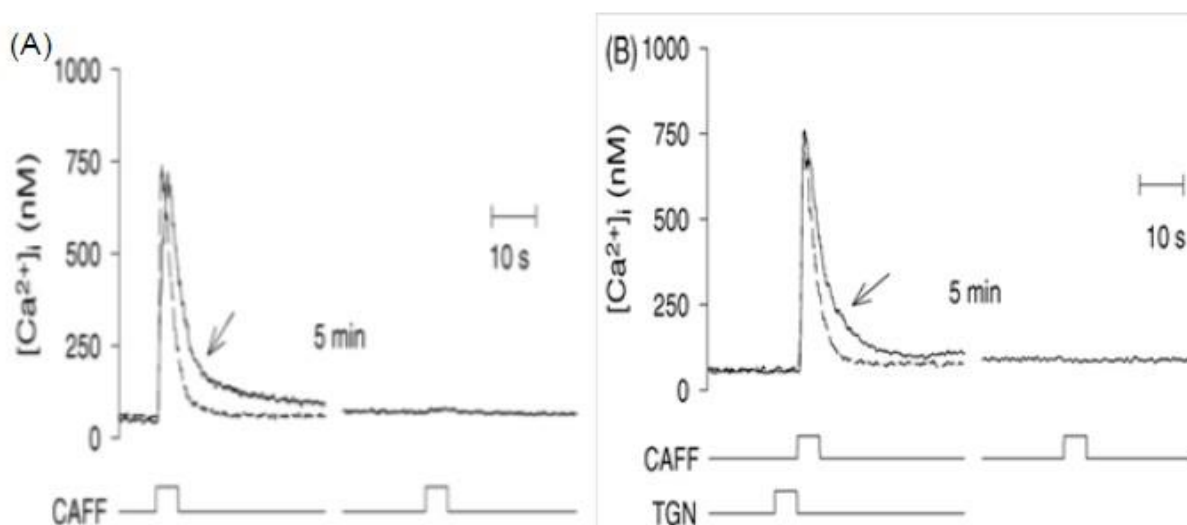


Figura 2.1. Efecto de rianodina y tapsigargina en el Ca^{2+} intracelular. En la imagen A se observa la respuesta a cafeína, las células fueron incubadas previamente con (línea sólida) o sin 10 μM de rianodina (línea punteada), y un segundo pulso de cafeína muestra que los depósitos de calcio que aportaban calcio al citoplasma están inhibidos o “vacíos” por la incubación con rianodina, esto se puede suponer de observar que la velocidad de recuperación del calcio basal es más lenta en presencia de rianodina debido al continuo vaciamiento del RS. Y en la imagen B se observa el efecto de 10 μM de tapsigargina (línea sólida) en un segundo pulso de cafeína, sugiriendo que no hay recuperación de los depósitos al inhibir a la bomba SERCA. (Figuras tomadas de Gómez-Viquez et al., 2005).

Por otra parte, la tapsigargina fluorescente mostró que la bomba SERCA se expresa preferentemente en las regiones perinucleares y superficiales de las células del músculo liso (Gómez-Viquez et al. 2010) (Figura 2.2B). Mientras que hay una señal extremadamente baja en la región citoplasmática y esta distribución particular de la bomba SERCA fue corroborada usando anticuerpos específicos (Clark et al. 2010). Estos datos sugieren que los RyRs en la región citoplasmática no coinciden con la bomba SERCA (Figura 2.2C y 2.2D).

Como se abordó en la introducción, las reservas de Ca^{2+} ácidas pueden diferenciarse del RE/RS porque estos depósitos son sensibles a la bafilomicina, un inhibidor irreversible de la bomba de H^+ de tipo V (Bowman et al. 1988). Esta bomba produce un gradiente de H^+ que se utiliza para acumular Ca^{2+} en los compartimentos ácidos. Sin embargo, en las células de mamíferos la naturaleza de estos almacenes de Ca^{2+} ácidos no está muy bien definida ya que, comprende desde el aparato de Golgi, endosomas, vesículas secretoras hasta los lisosomas.

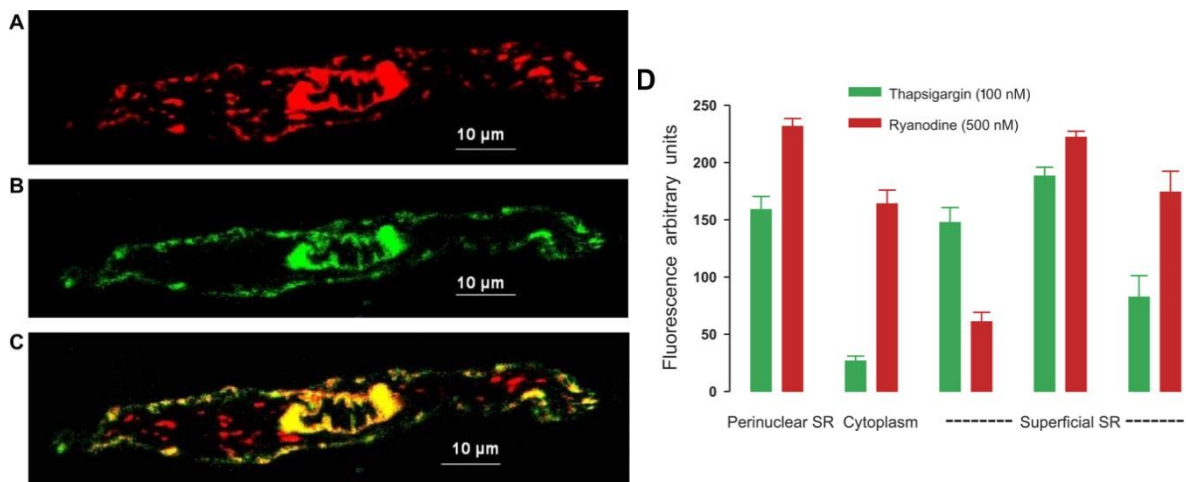


Figura 2.2. Colocalización de la bomba SERCA y de los RyRs en células de músculo liso teñidas con indicadores fluorescentes. A y B: imágenes confocales de células de músculo liso teñidas con 500 nM de rianodina BODIPY-TR-X (A) y 100 nM de tapsigargina BODIPY-FL (B) durante 5 min para determinar la distribución de los RyRs (A) y de las bombas SERCA (B), respectivamente C: imagen combinada que indica colocalización de estas dos proteínas (amarillo). D: cuantificación de la señal de fluorescencia de los pixeles después de la sustracción de fondo para cada canal (barras rojas: BODIPY-TR-X rianodina; barras verdes: BODIPY-FL tapsigargina) en tres diferentes regiones (perinuclear, citoplasmático y superficial). (Figuras tomadas de Gómez-Viquez et al., 2010).

Además, se ha observado que la cafeína reduce el Ca^{2+} luminal en trans-Golgi (Aulestia et al. 2015; Pizzo et al. 2010) y en gránulos secretores (Mitchell et al. 2001), pero esta reducción o liberación de calcio no se ve reflejada en el Ca^{2+} intracelular, aparte no se sabe si estos son RyRs o no. Ya que, en un estudio reciente (Ladenburger et al. 2009) se encontró que en *Paramecium* existen 34 genes relacionados con los RIP_3s y RyRs, los análisis filogenéticos mostraron que estos canales de liberación de Ca^{2+} (CRCs) se pueden subdividir en seis grupos (CRC-I a CRC-VI), cada uno con características que coinciden en parte ya sea con los RIP_3s o con los RyRs.

Se observó que la familia perteneciente a CRC-IV-1, cuya relación con RIP_3s y RyRs está restringida a su C-terminal, donde se encuentra la parte del canal, se localiza principalmente en vesículas corticales de calcio (sacos alveolares) y en el RE. Además, se exploró que la exposición a activadores del RyR como son el cloro-m-cresol o la cafeína inducen la liberación de calcio de los compartimentos intracelulares y esta liberación se vio fuertemente inhibida al eliminar la expresión de dichos canales, los cuales como se mencionó anteriormente no son el RyR pero comparten cierta región del canal (Ladenburger et al. 2009).

En un trabajo hecho por Brailoiu y colaboradores se observó que la acetilcolina libera Ca^{2+} a través de un mecanismo que es sensible tanto a la rianodina como a la bafilomicina (Brailoiu et al. 2010) (Figura 2.3). Esto no parece ser un caso generalizado porque la activación de los receptores muscarínicos M_3 , en el músculo liso visceral, libera Ca^{2+} del ER mediante la activación de IP_3Rs (Rueda et al. 2002).

Por otra parte, en muchos casos, se ha argumentado que una pequeña liberación de Ca^{2+} a partir de almacenes ácidos es fuertemente amplificada por la liberación de Ca^{2+} desde el RE a través de RyR (Morgan et al. 2013b; Calcraft et al. 2009; Guse & Wolf 2016). Por ejemplo, los receptores de integrina desencadenan una liberación lenta de Ca^{2+} a partir de almacenes internos por un mecanismo que es sensible tanto a la rianodina como a la bafilomicina, pero no está claro el papel desempeñado por los RyR en la respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Umesh, M. A. Thompson, et al. 2006).

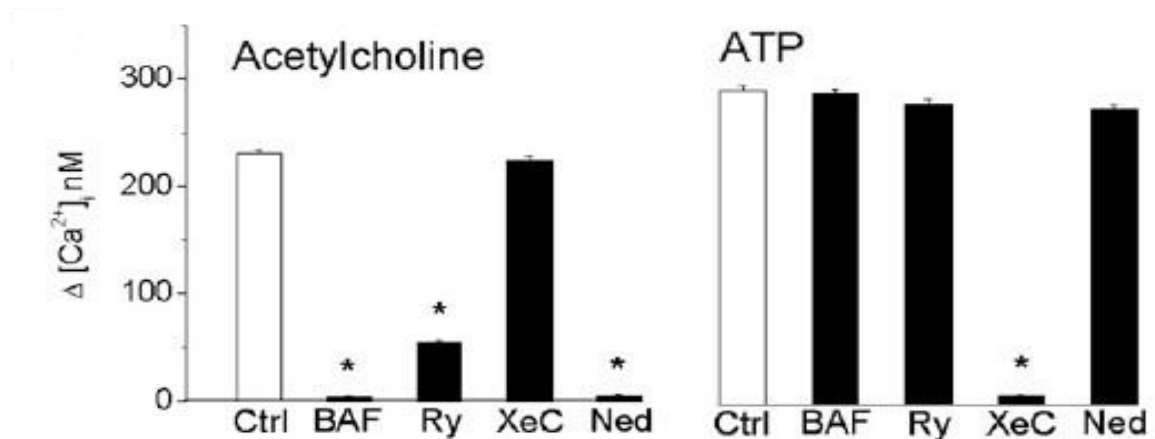


Figura 2.3 Los depósitos ácidos de calcio en las células endoteliales se reclutan de una manera específica dependiendo del agonista. Respuesta del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a acetilcolina o a ATP en presencia o ausencia de los diferentes inhibidores: BAF (bafilomicina), Ry (Rianodina), XeC (xetospongina C, inhibidor del RIP_3), Ned (Ned-19, antagonista del receptor a NAADP) (Figura tomada de Brailoiu et al. 2010).

Por lo tanto, la pregunta es si estos depósitos ácidos tienen RyRs y si este fuera el caso, entonces cuál es el efecto en la $[Ca^{2+}]_i$. Esto no es tan fácil de responder porque, se ha demostrado la existencia de canales permeables al Ca^{2+} que son activados por la cafeína, pero que son refractarios a la acción de la rianodina. Este canal fue descrito en las células del músculo liso (Guerrero et al. 1994) pero parece ser un caso generalizado puesto que está presente en otro tipo de células (Corda et al. 1995; Hoesch et al. 2001; Zhang et al. 2007).

Por otra parte, se han llevado a cabo experimentos donde se miden regiones específicas de la célula en diferentes tipos celulares como son las células del acino pancreático (Fedirko et al. 2009) y los astrocitos (Blaustein & Golovina 2001; Golovina & Blaustein 1997). En el primer caso debido a que las células tienen polaridad, se distinguen dos depósitos diferentes de calcio, uno cercano al núcleo en la parte basal de la célula y el otro en organelos ácidos cercanos a la parte apical de la célula (ácido calcisomas) donde la liberación de Ca^{2+} vía el IP_3R es diferente.

En el caso de los astrocitos se describieron depósitos de Ca^{2+} heterogéneos y en subcompartimentos que pueden liberar Ca^{2+} independientemente de otras regiones que

lo capturan, y que no es fácil explicar estas diferencias cuando no hay barreras de difusión en el retículo endoplásmico.

3. JUSTIFICACION

El retículo endoplásmico o sarcoplásmico es el principal depósito de Ca^{2+} , que es liberado por la activación del RyR, pero no está claro si los depósitos ácidos también tienen este canal o están activando al RyR que se encuentra en el retículo. Además, aún no se sabe la cantidad de calcio almacenada en los depósitos ácidos.

Para poder resolver estas incógnitas decidimos llevar a cabo registros simultáneos de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal usando fura-2 y Mag-Fluo-4, respectivamente y además con resolución subcelular, para lo cual se usa el microscopio confocal.

La activación del RyR se llevará a cabo con cafeína y se definirá la presencia del mismo basándonos en la sensibilidad a la rianodina de la respuesta a cafeína y se utilizará tapsigargina para definir al RS, puesto que requiere la actividad de la bomba SERCA. Utilizaremos la bafilomicina, inhibidor de la ATPasa de H^+ vacuolar, para definir aquellos depósitos de naturaleza ácida. Además, se tratará de determinar la distribución espacial de los diferentes componentes de estos depósitos intracelulares de calcio.

4. HIPÓTESIS

Las células de músculo liso presentan al menos dos depósitos intracelulares de Ca^{2+} diferentes, los cuales liberan a este ion por la acción de la cafeína, pero que presentan diferentes mecanismos de cargado de Ca^{2+} . Uno de ellos es el RS con la bomba SERCA sensible a tapsigargina y el otro podría ser depósitos ácidos sensibles a bafilomicina.

5. OBJETIVO GENERAL

Identificar los depósitos intracelulares de calcio sensibles a cafeína y su capacidad para modificar el calcio citoplásmico, con resolución subcelular y temporal, en células de músculo liso de la vejiga urinaria del cobayo.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la función de convolución del microscopio confocal para definir su límite de resolución espacial.
2. Estudiar la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína y su sensibilidad a la tapsigargina de los depósitos intracelulares en tres regiones específicas de la célula, que son la superficial (o submembranal), la perinuclear y la citoplasmática.
3. En las tres regiones celulares establecidas, determinar la naturaleza del depósito de calcio resistente a la tapsigargina, mediante el uso de la bafilomicina, un inhibidor de la ATPasa de H^+ .
4. Determinar la sensibilidad a la rianodina de la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} , reportados por el Mag-Fluo-4.
5. Estudiar la distribución espacial del Mag-Fluo-4 utilizando microscopía confocal, y contrastarlo con indicadores fluorescentes de los diferentes compartimentos celulares (retículo endoplásmico, mitocondria y lisosomas).
6. Determinar el papel que juegan estos depósitos intracelulares de Ca^{2+} en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a cafeína.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 Determinación de la función de dispersión de la luz (PSF) del microscopio confocal.

Con el fin de conocer la resolución real del microscopio confocal de Zeiss LSM 700, el cual se utilizó para todos los experimentos reportados en este trabajo, se realizó la determinación de la función de dispersión de la luz o PSF (Point Spread Function por sus siglas en inglés). Para ello se utilizó el kit TetraSpeck™ Fluorescent Microspheres Size (Molecular Probes), el cual consta de un portaobjetos donde están montadas, en diferentes pozos, micro esferas fluorescentes de diferentes tamaños y el sexto pozo corresponde a una mezcla de todos los tamaños (Véase figura 7.1).

El protocolo utilizado para la obtención del PSF fue el reportado por Cole y colaboradores (Cole et al. 2011), el cual consiste, a grandes rasgos, en utilizar las micro esferas de 0.1 μm con el objetivo de 63x (1.4 N.A.), en el modo de adquisición de Z- stack (por rebanadas), siguiendo los siguientes parámetros, el tamaño de la imagen de 1024 x 1024 pixels, 12-bits de resolución, tamaño entre cada rebanada de 100 nm, velocidad de adquisición de 8 (1.63 seg), promedio de los canales de 4, escaneo no direccional, zoom de 2 y el tamaño del “pinhole” de 1 unidad de Airy (AU) .



Figura 7.1. Kit TetraSpeck™. Micro-esferas de diferentes tamaños en un portaobjetos, la posición 1 con un tamaño de 4 μm ; 2ª posición de 1 μm ; posición 3 de 0.5 μm ; posición 4 de 0.2 μm ; posición 5 de 0.1 μm y posición 6 contiene la mezcla de todas las anteriores.

Una vez enfocadas las perlas se seleccionó la opción de Z-Stack con un intervalo de 0.1 μm entre cada corte, se corroboró que las imágenes de las esferas no estuvieran saturadas en intensidad, se ajustaron los parámetros de ganancia digital y ganancia master para cada uno de los canales que conforman la imagen, en este caso para el canal en verde (448 nm) o rojo (555 nm).

Después de capturar las imágenes en Z-Stack, éstas se analizaron con el software de ImageJ con el plug-in MetroloJ (Matthews & Cordelières 2010) para obtener los datos de PSF. Cabe mencionar que por cada imagen (campo) se capturaron varias esferas y debido a que el plug-in MetroloJ únicamente puede analizar una esfera, se procedió a realizar un corte a cada una de ellas y así analizarlas de manera individual.

En el plug-in MetroloJ se seleccionó la opción de medición de PSF, la cual despliega una ventana para indicar algunos de los parámetros antes mencionados. El programa arrojó un reporte (ejemplo en la figura 7.2) que muestra las vistas axial y lateral de la microesfera, además de un resumen donde se indicó la resolución teórica y calculada para cada uno de los tres ejes: X, Y y Z. Así mismo se obtiene el estadístico que muestra el promedio de intensidad para cada eje. Una vez analizadas todas las imágenes de las microesferas, para cada uno de los láseres, se recolectaron los datos y se procedió a realizar el análisis estadístico por ajuste a una curva de distribución normal.

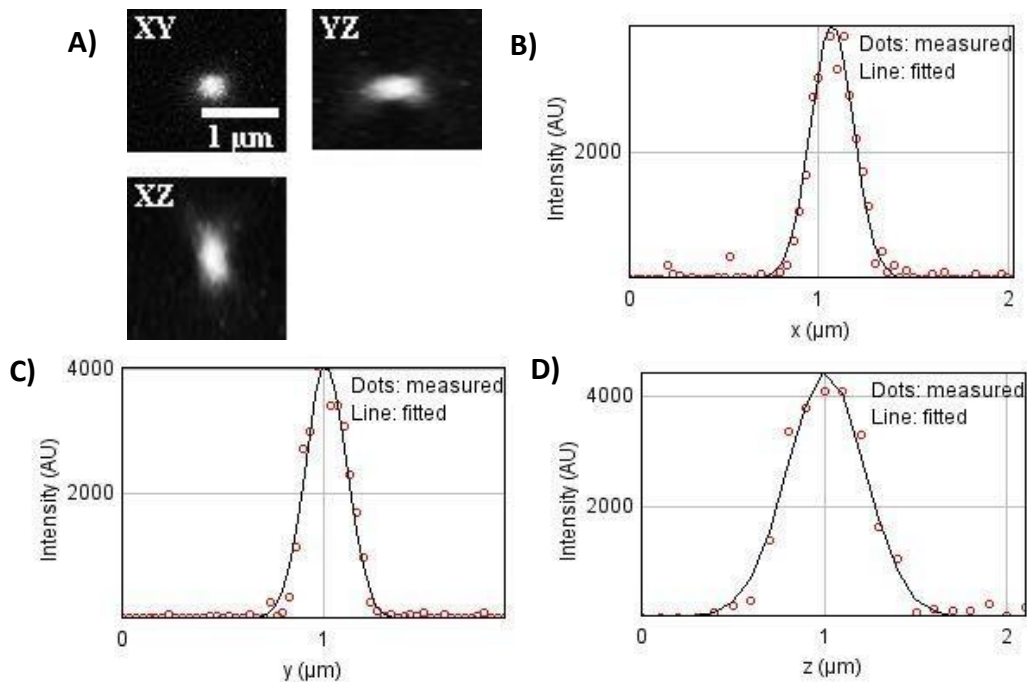


Figura 7.2. Ejemplo de un reporte del PSF, adquirido mediante el plugin Metroloj de imageJ, aplicado a una micro esfera de 100 nm (utilizando el láser de 555 nm). A) Imágenes de perfil de la micro esfera con los diferentes ejes. Ajustes normalizados del perfil de intensidad, para conocer la resolución real tanto en B) “x” C) “y” D) “z”.

7.2 Obtención de células individuales a partir del tejido muscular de la vejiga del cobayo.

Las células se obtuvieron de la vejiga de cobayos machos con un rango de peso de 380 a 430 g, los cuales se sacrificaron por dislocación cervical. La vejiga se disecó y se colocó en una caja Petri con una solución de disección (su composición se describe en la sección de soluciones y sustancias). Posteriormente a la vejiga se le hizo un corte longitudinal, se lavó y se cambió a otra caja Petri con solución de disección limpia, donde se removió de forma mecánica la mucosa para descubrir al músculo detrusor.

Una vez limpiada la vejiga, una porción de aproximadamente 200 mg de peso, se cortó en trozos de aproximadamente 20 mg de peso. Estos trozos se incubaron en una solución de disección que contenía 1.5 mg/ml de papaína (Sigma, 14 unidades/mg de peso sólido) y 2.5 mg/ml de colagenasa tipo IA (Sigma, 414 unidades/mg de peso sólido) ambas proteasas habían sido previamente activadas.

El proceso de activación de las enzimas proteolíticas es el siguiente: la papaína se incubó durante 20 min con un quelante de cationes divalentes (EDTA 200 μ M) y un compuesto reductor (DTT, 200 μ M) donde el primero remueve al ion Zn^{2+} del sitio activo y el segundo reduce el grupo sulfihidrilo de la cisteína que lleva a cabo el ataque nucleofílico al enlace peptídico. Una vez terminada la activación de la papaína, en otro tubo, se disolvieron 6.5 mg de colagenasa en 250 μ l de solución de disección y se adicionaron 5 μ l de una solución 100 mM de $CaCl_2$. Posteriormente se mezcla la solución de colagenasa con la solución de papaína activada y se procedió a la digestión del tejido (Muñoz A, et al. 1998; Rueda et al. 2002; Gómez-Viquez et al. 2005).

La digestión se llevó cabo a 25°C durante 90 min con agitación constante. Acto seguido, el tejido se sometió a 2 periodos de lavado de 15 min cada uno, lo cual consistió en incubar el tejido en solución de disección con DNasa I con la finalidad de eliminar el DNA liberado al medio por las células que no resistieron el procedimiento. Una vez terminados los periodos de lavado, se obtuvieron células individuales del tejido por medio de dispersión mecánica con una pipeta de plástico.

La dispersión celular se observó bajo el microscopio para determinar la calidad y cantidad de las células obtenidas, lo cual sirvió de referencia para conocer el volumen necesario para la preparación celular a utilizar en las incubaciones con los precursores del Mag-Fluo-4 y del Fura-Red (Mag-Fluo-4/AM y Fura-Red/AM) o con los diferentes colorantes de orgánulos según sean los experimentos a desarrollar.

7.3 Incorporación celular del Fura-Red, del Mag-Fluo-4 y de los indicadores para los diferentes orgánulos.

Para incorporar los indicadores fluorescentes en células aisladas del músculo detrusor de cobayo (ver figura 7.3-A), se hizo una adaptación del protocolo para Mag-fluo-4 usado por Susan Wray en el 2001 (Shmigol et al. 2001a), realizándose como se describe a continuación; para obtener una carga diferenciada se diluyó 1 μM de Mag-Fluo-4/AM en 300 μl de solución de disección con agitación en vortex en un tubo de ensayo, en ese mismo tubo se agregaron 700 μl de la suspensión celular que contiene a las células aisladas, se incubaron durante 1 hora a 25°C en condiciones de oscuridad, posteriormente se agregó 1.5 μM de Fura-Red/AM (ver figura 7.3-B), y se incubó por una hora en las mismas condiciones de temperatura y oscuridad.

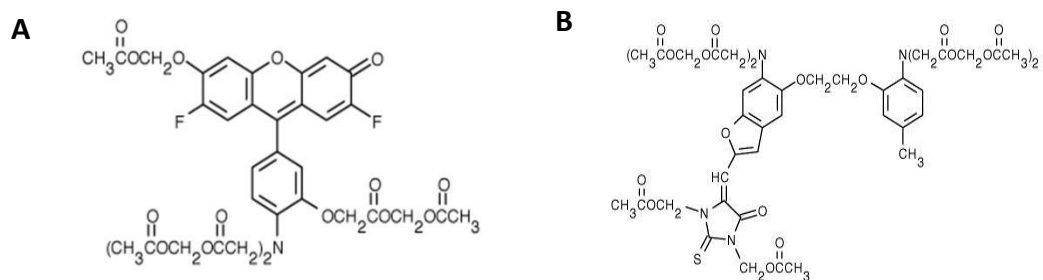


Figura 7.3 Fórmulas moleculares de A) Mag-Fluo-4/AM y B) Fura-Red/AM.

Una vez finalizada la incubación, se lavaron las células adicionando 3 ml de solución de disección, centrifugando a 2,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y la pastilla que contenía a las células se resuspendió en un ml de solución salina normal (para su composición véase la sección de “soluciones y sustancias”) y se mantuvieron en refrigeración a una temperatura entre

los 7-4°C durante un tiempo mínimo de 60 minutos en condiciones de obscuridad, antes de cualquier registro en el microscopio confocal.

Con respecto, al cargado de los indicadores de retículo endoplásmico (ER-tracker), mitocondria (tetrametil rodamina (TMRE)) y lisosomas (liso-tracker) (ver figura 7.4), la incubación de estos, se realizó después de la pre incubación por dos horas del Mag-Fluo-4. Para ER-tracker se incubaron las células por 30 minutos con una concentración de 1 µM, para TMR bastaron 15 minutos con una concentración de 50 nM y finalmente lisotracker, se utilizó a 30 nM por 30 minutos. Las células cargadas con los fluoróforos, fueron utilizadas el mismo día que se aislaron.

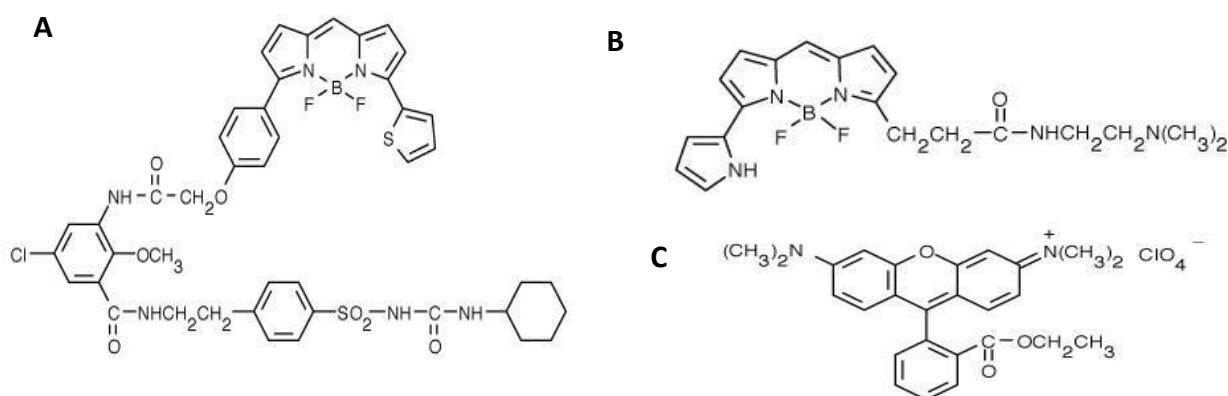


Figura 7.4 Fórmulas moleculares de los fluoróforos. A) ER-Tracker™ Red (BODIPY™ TR Glibenclamida) B) LysoTracker™ Red DND-99 y C) Tetrametil rodamina, Etil-Ester (TMRE).

7.4 Adquisición de imágenes por microscopia confocal y proceso de deconvolucion.

Una vez que los fluoróforos han sido incorporados en las células, éstas se visualizaron utilizando el microscopio confocal, para determinar si ocurría o no la colocalización del Mag-fluo-4 con los diferentes indicadores de los organelos intracelulares, es decir para determinar la frecuencia con que los colorantes estaban localizados en el mismo pixel. La cámara que contenía a las células se colocó sobre la platina del microscopio invertido Confocal Zeiss LSM 700 y se visualizaron utilizando los siguientes parámetros:

- Línea de excitación e intensidad del láser. Se utilizaron diversos láseres dentro del rango de luz visible para excitar los diferentes colorantes, en la tabla 1 se resumen las características de excitación, emisión e intensidad del láser que se usaron con cada indicador.

- Nivel de confocalidad (“pinhole”). Ya que cada objetivo tiene una función de dispersión de luz diferente que varía para cada longitud de onda; por lo mismo se empleó una confocalidad de 1 Airy (45 μm) para adquirir todas las imágenes de este trabajo.

- Ganancia del fotomultiplicador. Controla el grado de amplificación de la señal eléctrica generada a partir de los fotones emitidos por la muestra. Ésta se ajustó en cada imagen obtenida dentro del rango de 750 a 1100 unidades.

-Indicador de rango. Con el fin de mejorar la imagen y eliminar el ruido por saturación, se obtiene la imagen en pseudo-color con el indicador de rango para resaltar los pixeles en cero (azul) y saturados (rojo). Posteriormente se ajusta la imagen para reducir el número de pixeles que están saturados, reduciendo poco a poco la ganancia.

Cabe mencionar que en aquellos experimentos donde se requiere la detección de más de un fluoróforo, se debe verificar tener las condiciones que arrojen un mínimo de superposición en las señales de cada uno de los colorantes involucrados. Mientras que la elección de los fluoróforos a utilizar es importante, el uso de la óptica para la excitación de la muestra y la detección de la emisión es crucial para obtener un ensayo sensible y específico.

Por lo tanto, en los experimentos se usaron una combinación de filtros de excitación y emisión disponibles en el microscopio confocal, con el fin de eliminar el “crosstalk” entre las diferentes señales; lo cual nos permite tener la certeza de que la señal obtenida tiene una mínima contaminación por las otras sondas presentes (véase Tabla 1), esto con el fin de reducir el riesgo de tener colocalizaciones espurias. La adquisición de las imágenes para estudiar colocalización se obtuvo con las siguientes características homogéneas en todas las imágenes, con el fin de llevar a cabo el proceso de deconvolución. Se empleó el objetivo 63x, en modo “frame”, utilizando un

tamaño de pixel de aproximadamente 45 nm (“zoom” de 2.5), promediando 4 líneas y la adquisición fue multi-tracker (es decir la excitación no fue simultánea); por lo tanto, la velocidad de obtención de cada imagen fue alrededor de 4 a 5 segundos.

Tabla 1. Condiciones manejadas en el microscopio confocal para la adquisición de imágenes, en la tercera columna junto con el rango de emisión se especifica el tipo de filtro utilizado para evitar la superposición de las señales (SP=filtro de ancho corto, BP=filtro de ancho definido y LP=filtro de ancho amplio).

Colorante	Excitación	Emisión y filtro usado	Intensidad del láser
Mag-Fluo-4 (depósitos de Calcio)	488 nm	550 nm SP	0.2 %
Fura-Red (calcio citoplásmico)	488 nm	560 nm LP	0.2 %
TMRE (mitocondrias)	555 nm	580 nm LP	0.5 %
Lysotracker Red (lisosomas)	555 nm	640 nm LP	0.5%
ER-tracker (para RE)	555 nm	640 nm LP	0.5 %

Para el proceso de deconvolucion se generó, en primer lugar, un PSF teórico para cada longitud de onda utilizada, con el plug-in de ImageJ “*Diffraction PSF 3D*” empleando los siguientes parámetros:

- Índice de refracción del medio: 1.515
- Apertura numérica: 1.40
- Longitud de onda (nm): 488 o 555 (según sea el caso).
- Aberración esférica longitudinal, con la máxima apertura: 0.5
- Tamaño de pixel: 40
- Tamaño de la rebanada: 0
- Ancho (pixeles): 1024
- Alto (pixeles): 1024

Una vez obtenido el PSF correspondiente a cada longitud de onda, se llevó a cabo la deconvolución de cada imagen con el plug-in de ImageJ “*parallel iterative deconvolution 2d*” mediante el uso del algoritmo modificado de la norma con residuos mínimos y el descenso más empinado (MRNSD) (Piotr Wendykier 2009).

Cabe mencionar que en el caso de las células cargadas con mag-fluo-4 y fura red las imágenes de ambos fluoróforos se adquirieron en el modo “*time lapse*” en un total de 140 “frames” por experimento. El tiempo entre cada imagen con ambos indicadores de calcio, fue de 1.9 ± 0.3 segundos, este tiempo se logró tanto por solo promediar dos líneas, así como por el empleo de la configuración de adquisición de un solo “track”; la cual se puede usar únicamente cuando el mismo laser excita a ambos fluoróforos. Por otro lado, se debe aclarar que estas imágenes no se sometieron al proceso de deconvolución, debido a que fueron analizadas para observar los cambios de intensidad en ambos fluoróforos y de esa forma correlacionar estos cambios en el calcio intracelular y luminal.

7.5 Desarrollo de los registros simultáneos de Mag-fluo-4 y fura-red.

Las células se sacaron del refrigerador, se resuspendieron mediante agitación cuidadosa y se adicionaron 100 μ L de la suspensión de células cargadas con los dos fluoróforos a la cámara de registro, colocada sobre la platina del microscopio que previamente se le había añadido 200 μ L de la solución salina. Se permitió, por un periodo de 20 min, que las células se sedimentaran y se pegaran al fondo de la cámara, para evitar que las células se movieran durante la perfusión de las diferentes sustancias.

La microscopía confocal permite la captura de un número variable de píxeles (imágenes) a intervalos definidos (s o min) y el posterior procesamiento de las imágenes para obtener un “video” que permita observar la evolución de las señales de fluorescencia en el intervalo de tiempo definido. Esta aplicación fue de gran utilidad, puesto que así pudimos observar los efectos al agregar los diferentes estimuladores o inhibidores, en un tiempo determinado y el efecto cuando se remueven de la cámara de registro.

El procedimiento en la mayoría de los registros, para observar el cambio de Ca^{2+} intracelular y luminal fue el siguiente (Figura 7.5), con dos pausas de 5 minutos sin adquirir imagen con el fin de recuperar los depósitos de Ca^{2+} , en la primera pausa se agregó uno de los diversos inhibidores junto con cafeína. Por lo tanto, el primer pulso de cafeína es la respuesta control, puesto que se obtiene en ausencia de inhibidores. A este protocolo le llamamos triple pulso de cafeína.

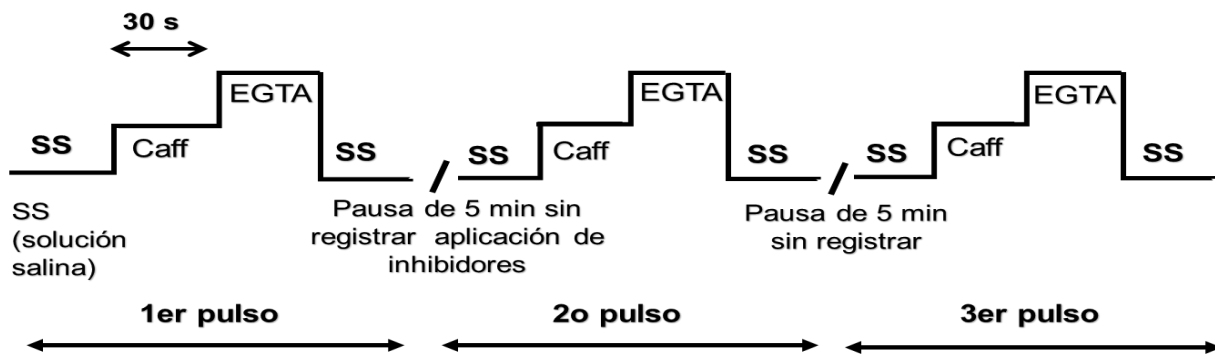


Figura 7.5. Protocolo para estimular a las células con cafeína (caff). La perfusión de cafeína fue seguida por una perfusión de solución de 0 Ca^{2+} (EGTA 1 mM) con el fin de determinar la necesidad de Ca^{2+} externo en la recuperación de la señal del mag-fluo-4, después se adiciono solución salina (SS). Siempre se dejó un periodo de 5 minutos sin realizar ninguna perfusión ni obtener imágenes para la recuperación de las señales de fluorescencia.

7.6 Análisis de colocalización y cuantificación de la fluorescencia.

El uso de un coeficiente de colocalización nos permite caracterizar el grado de traslape entre dos señales de fluorescencia en una imagen de microscopía. Se utilizó el coeficiente de Manders, el cual provee información de la fracción de la intensidad de un canal en particular que coincide con la señal de fluorescencia del otro canal, en otras palabras, podemos determinar la fracción de la señal de los píxeles rojos que colocalizan con los píxeles verdes, y viceversa (Bolte & Cordelieres 2006). Estos coeficientes se calculan a partir de las siguientes fórmulas.

$$M_1 = \frac{\sum R_{i,coloc}}{\sum R_i} \quad \text{y} \quad M_2 = \frac{\sum G_{i,coloc}}{\sum G_i}$$

Dónde:

R_i : Es la intensidad promedio del fluoróforo rojo.

G_i : Es la intensidad promedio del fluoróforo verde.

Para cuantificar la colocalización, las imágenes adquiridas por microscopía confocal se analizaron con el programa **Image J** en el apartado de rutinas añadidas (*plugin*) se seleccionó la opción de JACoP (Just Another Colocalisation Plugin) (Bolte & Cordelieres 2006), seguida del coeficiente de Manders (M_1 and M_2). Esto se realizó en las 3 diferentes regiones de interés, los valores del coeficiente de Manders varían de 0 a 1, de forma arbitraria consideramos que un número mayor de 0.5 indica la presencia de colocalización mientras que un número menor significa ausencia de colocalización (Zinchuk & Zinchuk 2008).

Para determinar el “background” (fondo) de las imágenes a analizar se calculó la desviación estándar de la distribución de la fluorescencia de los píxeles y su promedio, esta distribución se ajustó a una distribución normal. El Teorema de Chebyshev sirve para demostrar cómo la desviación estándar es indicadora de la dispersión de la distribución de una variable aleatoria, además una de las ventajas de este teorema es que se aplica a cualquier conjunto de datos, sin importar en que forma estén distribuidos; pero se ha visto en la práctica que, si un conjunto de datos se distribuye, aproximadamente, en forma de campana es posible aplicar en ellos la llamada, regla empírica.

Esta regla permite encontrar el porcentaje de datos que debe estar dentro de determinadas desviaciones estándar respecto a la media. A continuación, se determinan estos porcentajes: aproximadamente el 68% de los datos están a menos de una desviación estándar de la media, aproximadamente el 95% de los datos están a menos de dos desviaciones estándar de la media y finalmente casi todos los datos de la muestra están a tres desviaciones de la media. Con ello se calculó dos veces la desviación estándar más el promedio de cada imagen con el indicador a analizar y ese fue el valor del fondo que se tomó para el coeficiente de Manders.

Por otro lado, la intensidad de fluorescencia del Mag-Fluo-4 mostró una lenta pero continua reducción debido al apagamiento del fluoróforo por el láser y a su salida de la célula. Esta reducción (véase figura 7.6) se tomó en consideración mediante un ajuste no lineal utilizando los primeros puntos del registro (antes de que se aplicara algún estímulo) y la ecuación de la forma:

$$Y = A_0 \cdot e^{(-kx)} + y_0$$

De este análisis se obtienen las variables que conforman la ecuación como son A_1 , y_0 y k esta última representa la velocidad de reducción de la señal del fluoróforo, cabe mencionar que este ajuste se llevó a cabo en células sin perfundir ninguna solución y también en células sometidas a la perfusión con SS (“lavadas”) para observar si existía una diferencia significativa entre la reducción de la intensidad del fluoróforo una vez adicionando la solución (véase figura 7.6).

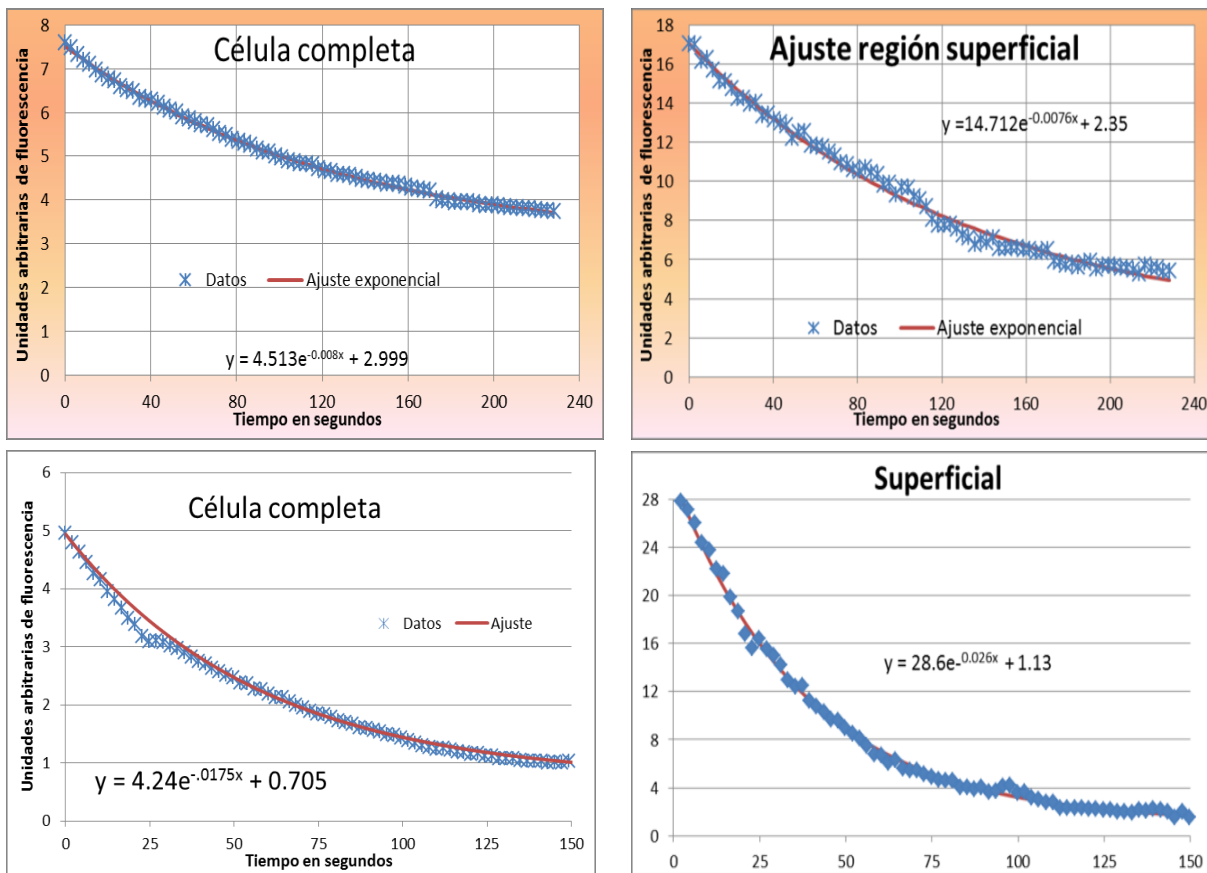


Figura 7.6. Ejemplo del ajuste no lineal realizado a una célula previamente cargada con Mag-Fluo-4. Se realizó el protocolo de series temporales sin añadir ningún estímulo (imágenes superiores) o con el paso de la solución normal (imágenes inferiores), se observa el cambio de la intensidad de la fluorescencia durante el tiempo y se percibe el apagamiento del fluoróforo, tanto en célula completa (imágenes de la izquierda) o en una región cercana a la membrana plasmática (imágenes de la derecha).

Este análisis nos permite utilizar una ecuación mono-exponencial para normalizar los cambios en fluorescencia y distinguir aquellos que se deben a cambios de la concentración de Ca^{2+} de los ocurridos por otras razones. Es importante recalcar que la reducción de la fluorescencia es muy común y que se observa aún con indicadores proteicos que tienen péptidos señales de localización en el RS (Canato et al. 2010).

Nótese que sólo en la región superficial y en la célula completa se observaron diferencia significativa entre las células perfundidas y aquellas que no lo fueron, tanto en el valor de k como el valor de y_0 (Figura 7.7). Esto nos sugiere que el colorante se está fugando de la célula de una forma lenta pero constante y que la perfusión pudiera estar acelerando este mecanismo por facilitar la remoción del colorante de la membrana plasmática.

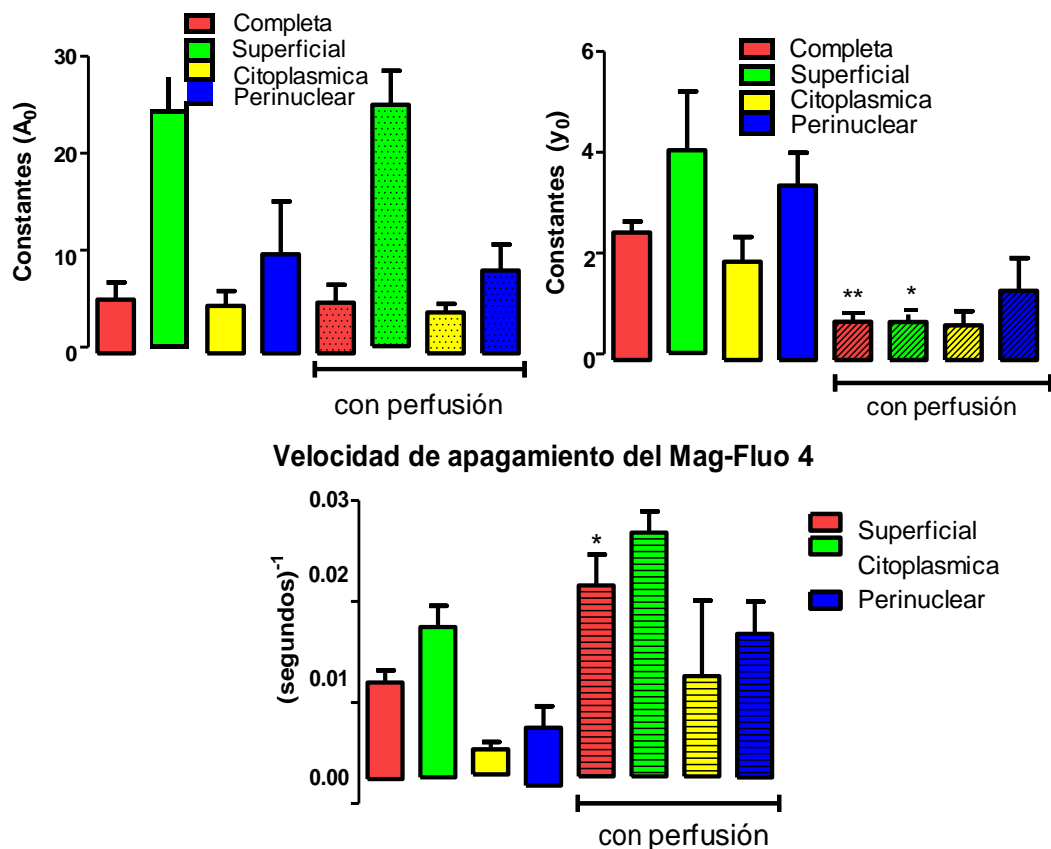


Figura 7.7. Estadístico de las variables que involucran el ajuste no lineal del apagamiento del Mag-Fluo-4 en diferentes regiones de interés. Las gráficas representan el análisis estadístico de cada una de las variables A_0 , y_0 y k (velocidad) comparándolas entre las células que se mantuvieron registrando sin perfusión con aquellas que se perfundieron con solución salina.

Cabe mencionar que la señal de fluorescencia del Fura Red no mostró el mismo comportamiento que el mag-fluo-4 y sólo se redujo su fluorescencia ante un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y por lo mismo, antes de la normalización se le aplicó el inverso a esta señal (F_0/F), para observar los aumentos del calcio en el citoplasma como incrementos de la señal (véase figura 7.8). Ambas señales de los indicadores de calcio, se normalizaron de modo que el valor basal fuera de cero, $(\Delta F/F_0)$ para Mag-Fluo-4 y $(F_0/F)-1$ para Fura-Red.

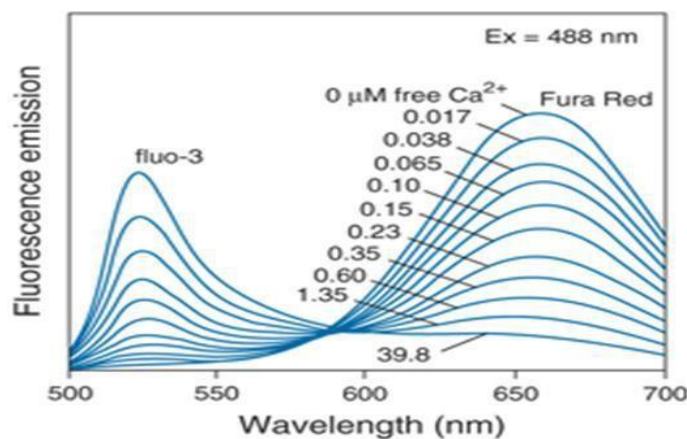


Figura 7.8 Los espectros de emisión de fluorescencia de una mezcla de indicadores en una proporción de 1:10 mol de fluo-3 y Fura Red, se excitan simultáneamente a 488 nm, en soluciones que contienen de 0 a 39.8 μM de Ca^{2+} libre.

7.7 Calibración del sistema de perfusión usado en el microscopio confocal.

La liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares se induce con la aplicación de cafeína a una concentración de 20 mM. En los experimentos en los que se utiliza el microfluorómetro se aplica la cafeína mediante un pulso neumático a través de micropipetas que contienen la solución, colocadas a unas micras de la célula de músculo liso que está siendo registrada, este sistema se conoce como picobomba y se ha utilizado en el laboratorio a lo largo de varios años. Sin embargo, esta picobomba no se ha instalado en el set del microscopio confocal y por lo mismo decidimos emplear un sistema de perfusión (cambio total del volumen de la cámara de registro).

Para conocer el curso temporal de recambio de las soluciones utilizamos una solución con 100 μM de fluoresceína que se perfundió en la cámara de registro.

Utilizando la configuración de escaneo mono-lineal del microscopio confocal se pudo detectar, con alta resolución temporal, el momento de llegada de la fluoresceína, así como su lavado, que se muestra en los ejemplos de la figura 7.9, de estos registros se hicieron más de 5 repeticiones.

Los registros de fluorescencia se analizaron por separado en dos fases. La fase de llegada de la fluoresceína a la cámara (subida), la cual se ajustó a una ecuación no lineal de la forma:

$$Y = y_0 (1 - e^{-kt}) + c$$

La fase de declive (lavado de la fluoresceína) que empieza cuando se le abre la llave del contenedor con solución sin fluoróforo, se ajustó a la ecuación de la forma:

$$Y = y_0 (e^{-kt}) + c$$

Donde $t_{1/2}$ se calculó a partir de la constante de velocidad k determinada para cada registro. El promedio del tiempo medio de la fase de subida fue de 0.4 ± 0.08 segundos y de la fase de bajada 0.7 ± 0.05 segundos.

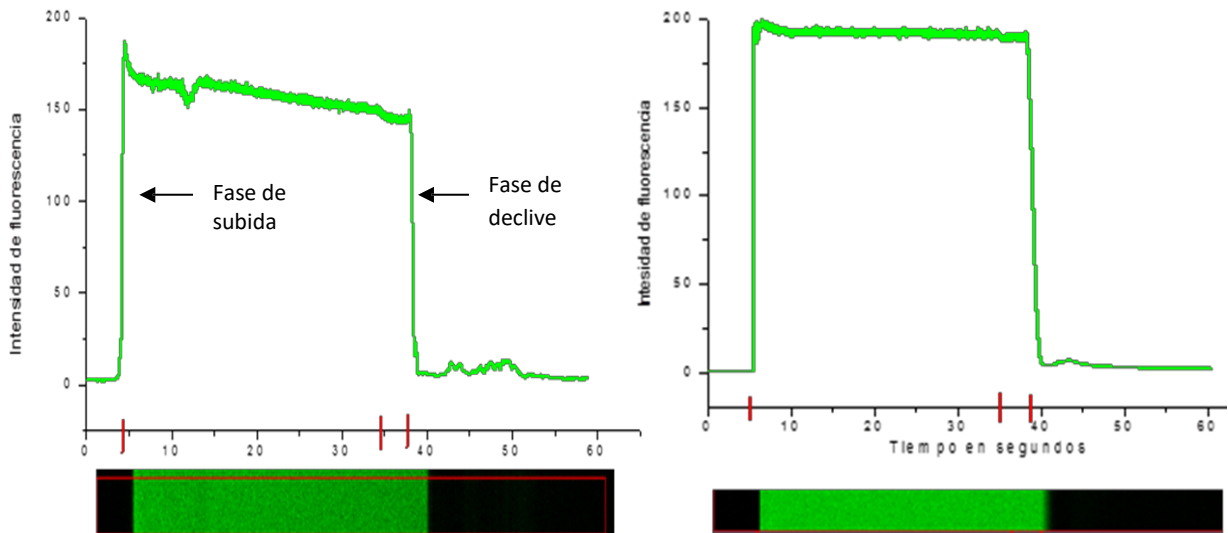


Figura 7.9. Imágenes obtenidas del registro realizado con el confocal en la configuración de escaneo monolínea de la perfusión con fluoresceína. Las líneas rojas indican: apertura de la llave que contiene fluoresceína, cierre de ésta y finalmente apertura de la llave de agua para el lavado, en el gráfico se muestra el perfil de intensidad promedio del área seleccionada en cuadro rojo, se observan las dos fases indicadas por flechas, las cuales se analizaron y se ajustaron como se menciona en el texto.

7.8 Soluciones y sustancias.

La solución de disección se preparó con los siguientes reactivos (en mM): 55 de NaCl, 6 de KCl, 5 de MgCl₂, 10 de glucosa, 80 de NaOH, 80 de ácido glutámico, y 10 de HEPES, pH de 7.4 ajustado con NaOH. La solución salina normal (SSN) usada para los registros contiene: 137 mM de NaCl, 5 mM KCl, 4 mM NaHCO₃, 10 mM de glucosa, 2 mM de CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM de Hepes y 0.42 mM de KH₂PO₄; ajustada a pH 7.4 con NaOH.

El Mag-Fluo-4/AM, el Fura-Red/AM, la tetrametil-rodamina (TMRE), el lyso- Tracker Red, el Bodipy TR-X ER-Tracker y la tpsigargina se compraron a Molecular Probes (Invitrogen). La cafeína, rianodina, Bafilomicina A1 y la fluoresceína se adquirieron en SIGMA-ALDRICH, esta última donada amablemente por la Dra. Marta Susana Fernández Pacheco. Todas las sustancias, excepto la cafeína y la fluoresceína, se disolvieron en DMSO (100 %) a una concentración 1000 veces mayor para que al final sólo se agregara 0.1% de DMSO a las células (1 µl por ml de solución). La cafeína se disolvió en fresco en solución salina normal y la fluoresceína en agua.

7.9 Análisis estadístico

En los registros de Ca²⁺ luminal e intracelular, una misma célula proporcionó al menos tres ROIs en cada una de las tres regiones diferentes, obteniendo más de 9 ROIs en toda la célula. Diferentes células implican una preparación celular diferente. Es importante mencionar que la respuesta control de las señales de Ca²⁺ fue aquella que se obtuvo en la primera aplicación de cafeína, ya que la segunda y tercera aplicaciones de cafeína dieron la misma señal que la primera cuando no se añadió ningún inhibidor. Por lo mismo se decidió utilizar la primera adición de cafeína como registro control. Esto implica que la misma célula, es tanto el control, como el experimento y por lo mismo podemos hacer la estadística pareada. Los datos de cada uno de los ROIs se usaron para determinar diferencias significativas usando la prueba t de Student pareada con una P <0.05 para los experimentos de registros de Ca²⁺ y en los experimentos de

colocalización se utilizó la prueba ANOVA de una sola vía con una $P < 0.05$ y con la prueba posterior de Dunnett.

8. RESULTADOS

8.1 Obtención del límite de resolución real del microscopio confocal LSM-700 y resultados del proceso de deconvolución.

Con la finalidad de conocer el límite de resolución que tiene el microscopio confocal en los ejes X, Y y Z bajo nuestras condiciones de trabajo, se determinó la función de dispersión de luz o PSF (por sus siglas en inglés), utilizando micro esferas multifluorescentes de 100 nm de diámetro con la metodología anteriormente explicada.

La tabla 2 muestra los valores de resolución obtenidos para cada uno de los tres ejes: X, Y y Z para el color verde (λ de excitación de 488 nm) comparados con sus correspondientes valores de resolución teórica según el objetivo utilizado. Se observa que para el eje X y Y la resolución fluctúa entre los 210 nm y para el eje Z entre los 400 nm. De la misma forma se realizó el análisis estadístico para la λ de excitación de 555 nm (color rojo), obteniendo los valores de resolución, los cuales oscilan entre los 245 nm para los ejes X y Y, mientras que para el eje Z fluctúa entre los 500 nm.

λ 488 nm	FWHM (μm)	Resolución teórica (μm)
X	0.226 ± 0.016	0.139
Y	0.200 ± 0.021	0.139
Z	0.438 ± 0.073	0.349

λ 555 nm	FWHM (μm)	Resolución teórica (μm)
X	0.256 ± 0.021	0.159
Y	0.233 ± 0.024	0.159
Z	0.514 ± 0.086	0.396

Tabla 2. Valores de resolución obtenidos para el láser con longitud de onda de 488 y 555 nm en los ejes X, Y y Z. Los datos representan el promedio de los valores obtenidos a partir de una muestra de 77 microesferas para 488 nm y 73 para 555 nm. El valor (en nm) del ancho a media altura, abreviada FWHM (del inglés Full Width at Half Maximum) es la resolución real calculada.

Una vez caracterizado el proceso de convolución del microscopio, los datos del PSF nos permitieron conocer la máxima resolución que tiene el microscopio confocal el cual es de 500 nm aproximadamente en el eje Z, y por lo tanto el tamaño del voxel es

de 20 millones de nm^3 , considerando el tamaño de los diferentes organelos se puede apreciar la posibilidad de que exista más de un organelo dentro de los ROIs utilizados para el análisis.

Cabe mencionar que todas las imágenes adquiridas para estudiar la colocalización de los indicadores de organelos, se procesaron con el algoritmo de deconvolución, con el fin de incrementar la nitidez de las imágenes. La deconvolución es una operación matemática que utiliza algoritmos para calcular y desechar la luz difractada, removiendo así la luz que está fuera de foco, e incrementando la resolución de las imágenes. Es importante recalcar que se utilizaron imágenes de perlas fluorescentes como control de que el programa de deconvolución no distorsionase la imagen original y que sólo incrementara la resolución.

Aunque el microscopio confocal deshecha una gran cantidad de luz fuera de foco, aun así, las imágenes deconvolucionadas muestran que este proceso matemático mejora aún más la imagen al incrementar la resolución, como se puede observar en las siguientes imágenes de células HeLa y de músculo liso que fueron previamente teñidas con rianodina fluorescente, y a las cuales se les aplicó el proceso de deconvolución (Figura 8.1).

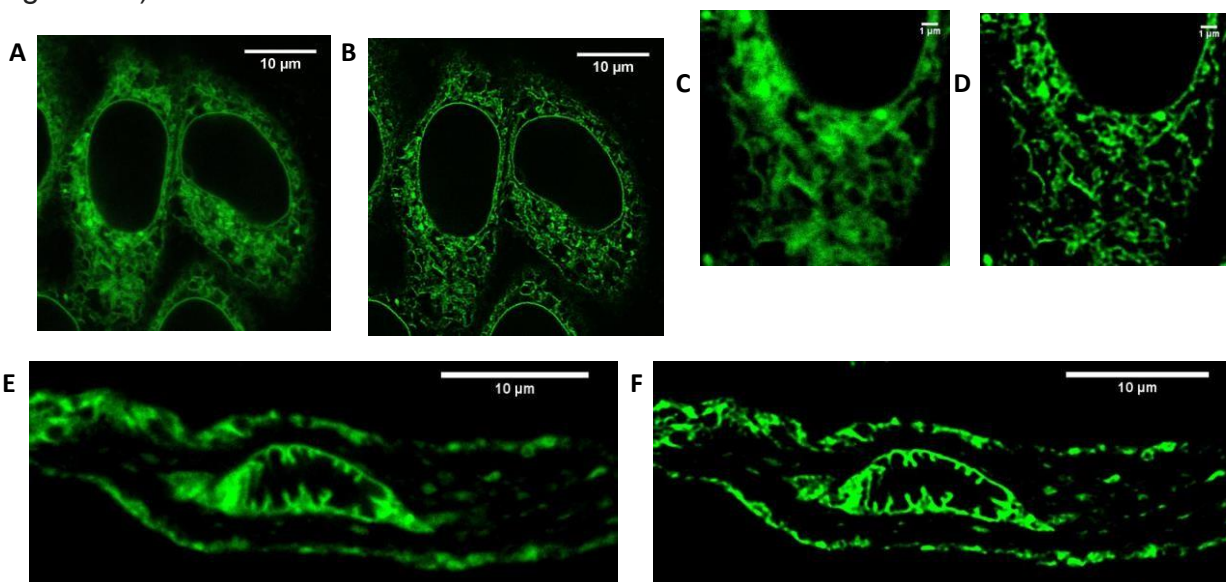


Figura 8.1. Células HeLa (A-D) y de músculo liso (E-F) previamente incubadas con rianodina fluorescente (10 μM por 10 minutos). Las imágenes mostradas en A, C y E corresponden a las imágenes originales adquiridas con el microscopio confocal, mientras las mostradas en B, D y F son las imágenes deconvolucionadas, donde se observa con mayor claridad las estructuras

definidas. Lo que se muestra en C y D es una amplificación de una región de lo mostrado en A y B, respectivamente.

8.2 Determinación simultánea del efecto de cafeína tanto en el calcio citoplásmico como en el calcio luminal en células de músculo liso recién aisladas.

Con la finalidad de observar los cambios simultáneos del calcio libre en los diferentes depósitos de calcio (regiones subcelulares) y en el citoplasma, se utilizó el protocolo mencionado en la sección de materiales y métodos, el cual consiste básicamente en incubar a las células con Mag-fluo-4/AM y con Fura-Red/AM. Para activar al RyR se perfundieron a las células con una solución salina que contenía 20 mM de cafeína, un alcaloide que al unirse al RyR, incrementa su actividad al aumentar su sensibilidad al Ca^{2+} citoplásmico, este ion es el agonista fisiológico del RyR (Sitsapesan & Williams 1990; Kong et al. 2008).

Las imágenes de célula completa se adquirieron utilizando el microscopio confocal, todos y cada uno de los experimentos donde se llevaron a cabo series temporales se adquirieron un total de 140 imágenes cada 1.9 segundos, éstas se analizaron, fuera de línea, con el programa **Image J** definiendo regiones de interés al trazar un área elíptica de alrededor de $8 \mu\text{m}^2$ utilizando la señal de Mag-fluo-4 en las tres regiones subcelulares especificadas de la célula (véase figura 8.2).

Cabe mencionar que, por la región perinuclear se analizaron por lo menos 4 ROIs (todos con alta fluorescencia del Mag-fluo-4), en la citoplásmica se analizaron tanto las regiones de alta intensidad de Mag-fluo-4 (ROI 2 figura 8.2) como aquellas donde la señal del mag-fluo-4 estaba muy cerca de la basal del indicador. Finalmente, en la región superficial todos los ROIs estuvieron definidos por regiones brillantes al Mag-fluo-4 (ROI 3 figura 8.2). La diferencia del número de ROIs entre cada región es debido al tamaño de la región analizada, donde en la región perinuclear fue la de menor número de ROIs debido al área pequeña en esta zona, y en la región citoplásmica fueron mucho más números de ROIs analizados debido a que esta zona es la de mayor área.

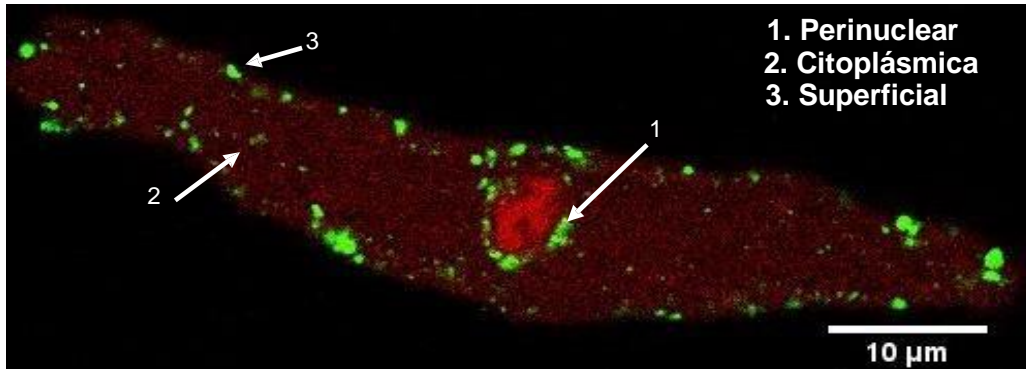


Figura 8.2. Célula de músculo liso cargada simultáneamente con fura red (rojo) y mag- fluo-4 (verde). En los círculos se muestran ejemplos representativos de las tres regiones analizadas con ambos colorantes. La idea es que las regiones verdes brillantes representan depósitos intracelulares de Ca^{2+} y fueron éstas las que se usaron como referencia para delimitar los ROIs de tres regiones diferentes (1, región perinuclear; 2, región citoplásmica y 3, región superficial). En el caso de la región citoplásmica se analizaron también ROIs que no contenían alta fluorescencia del Mag-fluo-4.

La aplicación de cafeína por 30 s, a las células de músculo liso, indujo una disminución de la señal de Mag-Fluo-4 en las regiones subcelulares y asociado a esto se observó un incremento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ según lo reportado por el Fura-Red. Una vez terminado el estímulo de cafeína la señal de Mag-fluo-4 continuó deprimida debido a la ausencia de Ca^{2+} externo y dicha señal se recuperó en presencia de Ca^{2+} externo (después de quitar la perfusión de solución salina suplementada con EGTA 2.0 mM) hasta llegar a los niveles basales. Dicha recuperación requiere la actividad de las bombas SERCA, pero de aquellas que se encuentran en la región superficial (véase la discusión). Un segundo y tercer estímulos con cafeína, después de esperar 5 minutos, produjeron la misma respuesta de vaciamiento del calcio presente en los depósitos, y de la misma forma se observó que el transitorio de calcio citoplasmático fue reproducible (Figura 8.3).

La región superficial mostró una alta intensidad de la señal del Mag-Fluo-4 y sin embargo se caracterizó por una mayor reducción de la fluorescencia en respuesta a la aplicación de cafeína con respecto a las otras dos regiones subcelulares. Nótese que a pesar de que la cafeína indujo una reducción casi inmediata del nivel de Ca^{2+} libre luminal de los depósitos, particularmente en la región superficial, el impacto que tuvo en la señal de Fura-red, es decir el Ca^{2+} citoplásmico, en esa región, fue de menor amplitud comparada con las otras dos regiones (Figura 8.4).

Esta aparente paradoja, de una mayor disminución del Ca^{2+} luminal, que no se ve reflejada en el incremento del calcio del citoplasma (Figuras 8.3 y 8.4), sugiere que no hay una correlación entre la reducción del Ca^{2+} luminal y el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Resulta interesante observar que la región con mayor amplitud en la respuesta del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es la región perinuclear, seguida de la citoplásmica y por último la región superficial. Esto implica que no hay una relación directamente proporcional entre el calcio luminal y el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

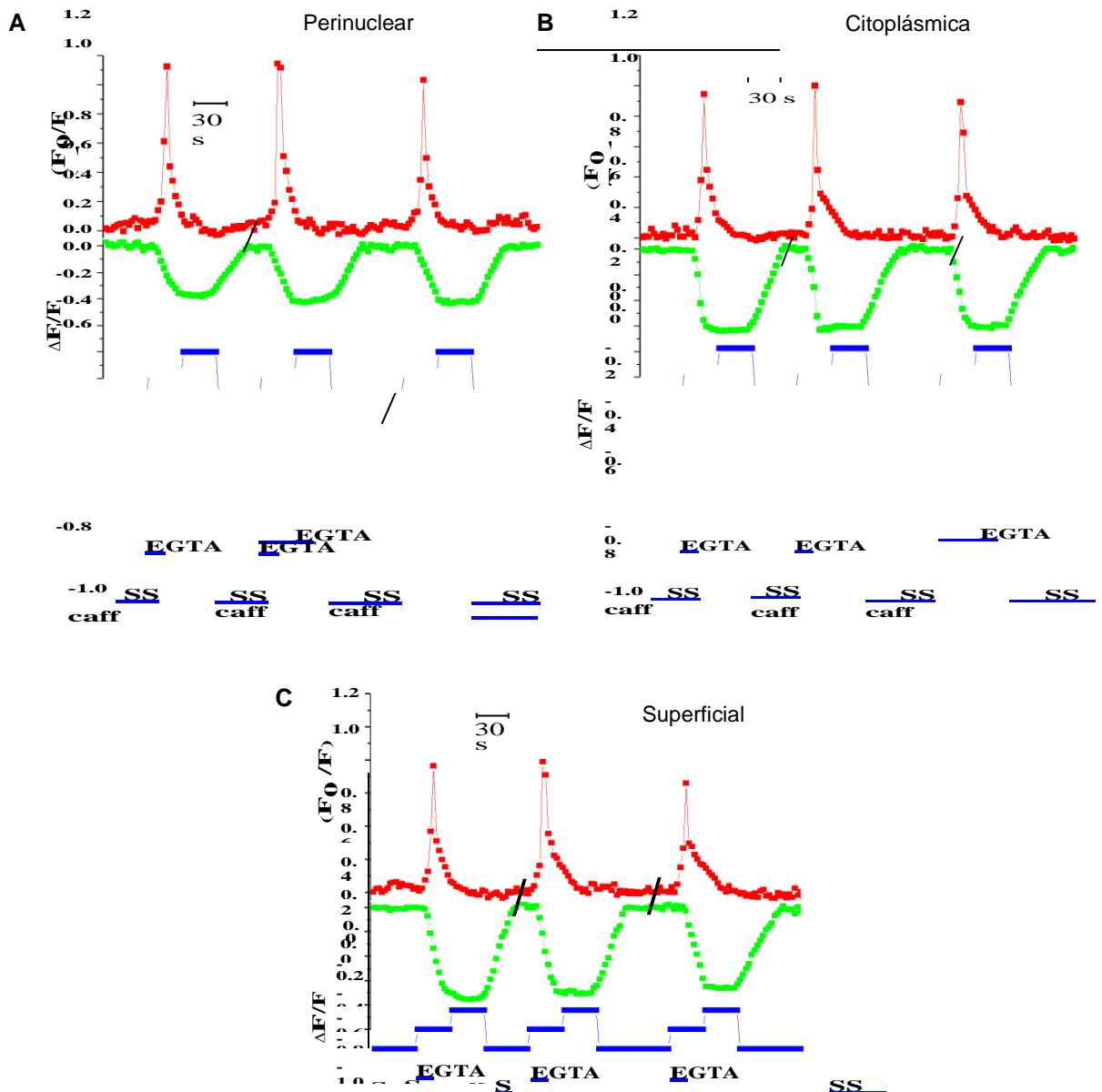


Figura 8.3. Efecto de la aplicación de cafeína (20 mM) en la señal de fluorescencia del Fura-red y del Mag-Fluo-4 en 3 regiones subcelulares diferentes de una misma célula (A-

C). Los puntos rojos representan el inverso de la fluorescencia del fura-red y los verdes la señal de Mag-Fluo-4, cada punto representa el valor del ROI después de haber sido normalizado a partir de imágenes adquiridas a una frecuencia de 1.9 ± 0.3 segundos. Cada gráfico indica la región analizada (A-perinuclear, B-citoplásmica y C-superficial) en respuesta a la cafeína (caff) y la ausencia de Ca^{2+} externo (EGTA). Este resultado es representativo de registros llevados a cabo en 6 células diferentes de 6 preparaciones diferentes.

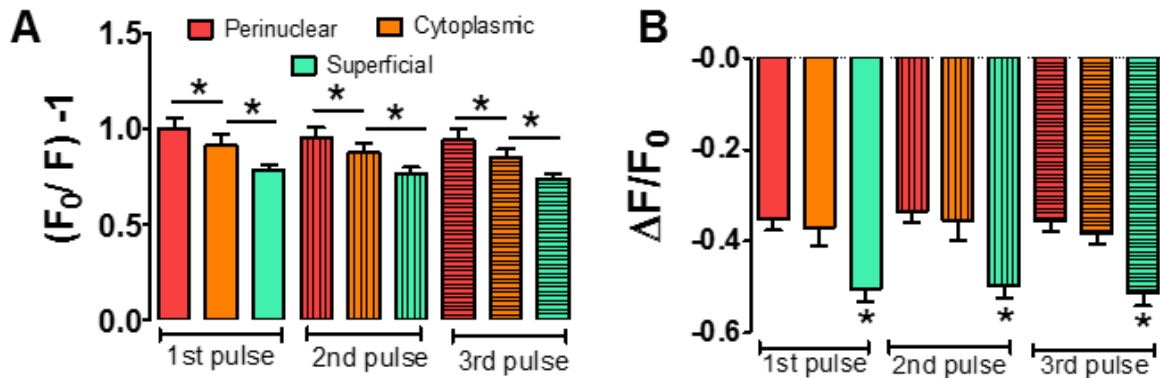


Figura 8.4. La respuesta a cafeína fue reproducible en una misma región, pero diferente entre las diferentes regiones subcelulares. A) Se muestra el promedio de las máximas respuestas a cafeína del transitorio de Ca^{2+} intracelular. **B)** Se muestra la máxima disminución de la señal del mag-fluo-4 en las diferentes regiones subcelulares y para las tres aplicaciones de cafeína. (n = 18 ROIs (3 por célula) de 6 células de diferentes preparaciones, *p<0.05, prueba t de Student pareada).

Con la finalidad de incrementar la resolución temporal durante la liberación de Ca^{2+} al citoplasma inducida por cafeína, se realizaron experimentos utilizando la configuración de escaneo mono-línea del microscopio confocal. En este caso las células de músculo liso se cargaron solamente con el indicador de Ca^{2+} intracelular, Fura-Red. Estos experimentos mostraron que la onda de Ca^{2+} se inicia en la región perinuclear, tardando alrededor de dos segundos en llegar a la superficie celular (Figura 8.5).

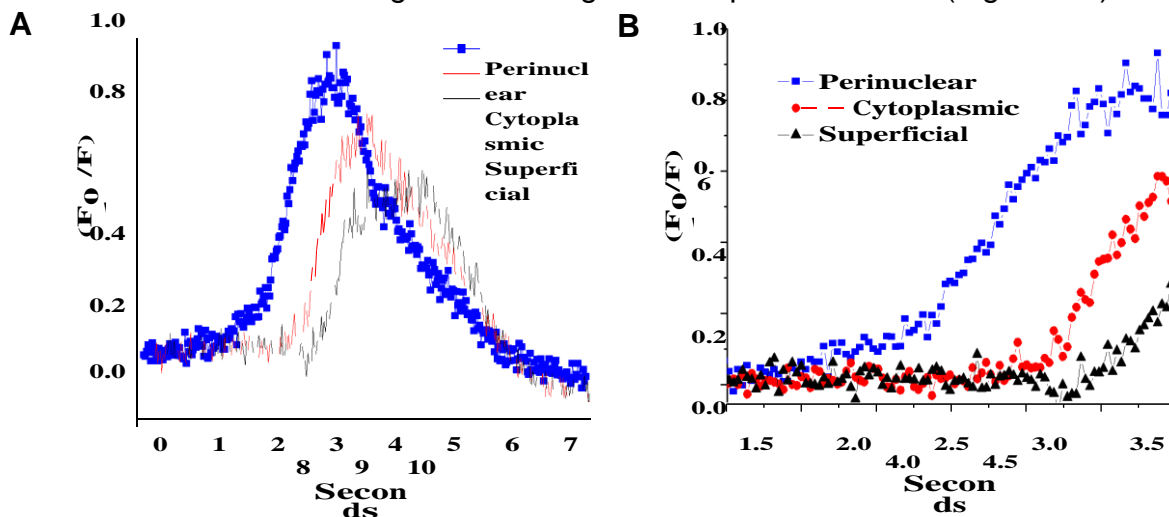


Figura 8.5. Onda de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por cafeína observada con alta resolución temporal. A) Grafica representativa, de 5 experimentos mostrando la respuesta $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por cafeína (aplicada en el tiempo cero) que muestra una onda de Ca^{2+} que inicia en la región perinuclear (trazo azul), continua en la región citoplásmica (trazo rojo) hasta llegar a la región superficial (trazo negro). **B)** Amplificación de la fase ascendente de la respuesta de Ca^{2+} .

8.3 Uso de rianodina para identificar al RyR como canal que es activado por cafeína en los depósitos intracelulares de Ca^{2+} reportados por Mag-Fluo-4.

Como se mencionó en la introducción, la cafeína además de activar al RyR, activa otros canales de calcio que no son modulados por la rianodina (Guerrero et al. 1994; Corda et al. 1995; Hoesch et al. 2001; Zhang et al. 2007; Ladenburger et al. 2009). Se sabe que la rianodina tiene la característica de interaccionar con el RyR sólo en la conformación abierta del canal (Pessah & Zimanyi 1991). Además, una vez que la rianodina se ha unido al receptor-canal, ésta impide que el canal se cierre dejándolo semiabierto o completamente obturado. En el primer caso se espera observar un vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+} y por lo tanto debería resultar en la reducción de la señal citoplásmica de Ca^{2+} inducida por cafeína (Gómez-Viquez et al. 2005).

Para determinar si las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, implicaba la activación de RyRs; se aplicó la combinación de cafeína (20 mM) más rianodina (100 μ M) por 30 segundos, durante la pausa de los 5 minutos, justo después de la primera aplicación de cafeína. La segunda y la tercera aplicación de la cafeína resultaron en una completa inhibición de la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 8.6-C). Sin embargo, en la $[Ca^{2+}]_L$ se encontraron dos tipos de respuestas diferentes. En la mitad de las células, el depósito de Ca^{2+} no fue vaciado por rianodina (Figura 8.6-A), mientras que la otra fracción de las células mostró un gradual y completo vaciamiento del depósito (Figura 8.6-B).

Sin embargo, la aplicación de la rianodina sí inhibió la reducción del $[Ca^{2+}]_L$ inducido por la cafeína para ambos tipos de respuestas (Figura 8.6-D). Estos datos sugieren que una misma concentración de rianodina puede dejar los RyRs de la región perinuclear en estado subconductante (depósito vacío) o completamente bloqueados (depósito lleno). En conclusión, las respuestas a cafeína involucran la activación de RyRs en la región perinuclear.

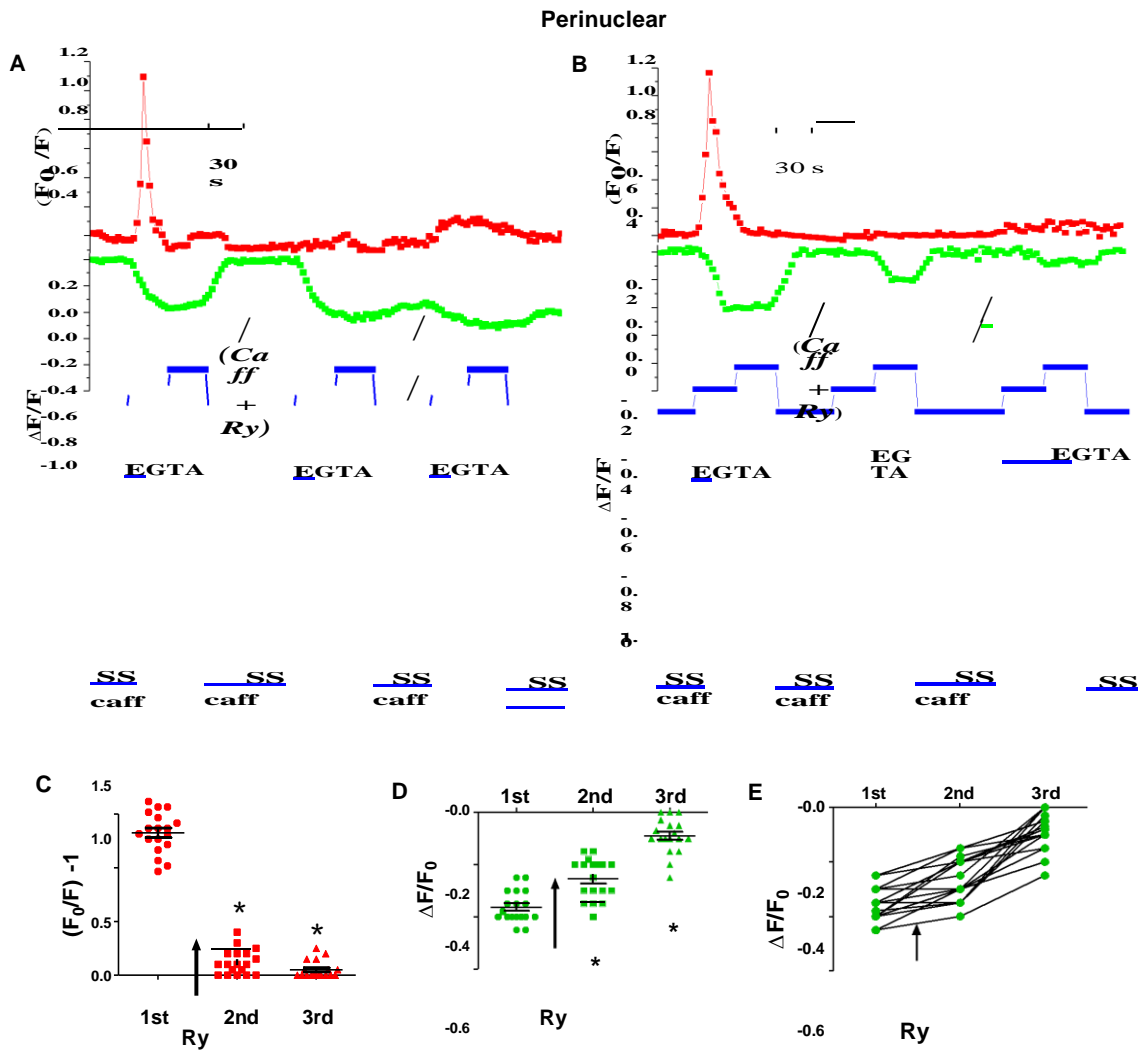


Figura 8.6. Efecto de la aplicación de la combinación de cafeína y Rianodina (Ry 100 μ M) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de Rianodina C) Pico de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$, para los tres pulsos de cafeína. D) y F) Reducción de la señal Mag-fluo-4 al final de la aplicación de los tres pulsos de cafeína. N = 18 ROIs, 6 células, *P <0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

El mismo experimento, pero en la region citoplásmica, inhibió la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$, particularmente en el tercer pulso de cafeína (Figura 8.7-C) y se observó el mismo comportamiento que en la region perinuclear, para el caso de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$, donde la respuesta a cafeína, de la mitad de las células, fue bloqueada por el efecto de rianodina (Figura 8.7-A) y la fracción restante mostró que el depósito fue completamente

vaciado (Figura 8.7-B). Sugiriendo que todos los depósitos reportados por el Mag-Fluo-4 que son liberables por cafeína, contienen al RyR.

Los depósitos intracelulares reportados por el Mag-Fluo-4 y que responden a cafeína en la región superficial, mostraron ser más complejos de lo esperado. No todos los ROIs de esta región fueron sensibles a rianodina, aproximadamente el 25% de los ROIs analizados fueron resistentes a la aplicación de este alcaloide, sin embargo,

responden a cafeína, ya que se observó la reducción de la $[Ca^{2+}]_L$ que no estuvieron acompañadas de un cambio transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 8.8-A).

Estos datos nos sugiere, que en esta región, existen canales activados por cafeína que serían insensibles a rianodina, canales de ese tipo han sido reportados por diversos grupos (Guerrero et al. 1994; Corda et al. 1995; Hoesch et al. 2001; Zhang et al. 2007; Ladenburger et al. 2009). El resto de los ROIs (75%) mostró la sensibilidad a la rianodina que se había observado en las otras regiones, sugiriendo que en estos depósitos sí estaría presente el RyR (Figura 8.8).

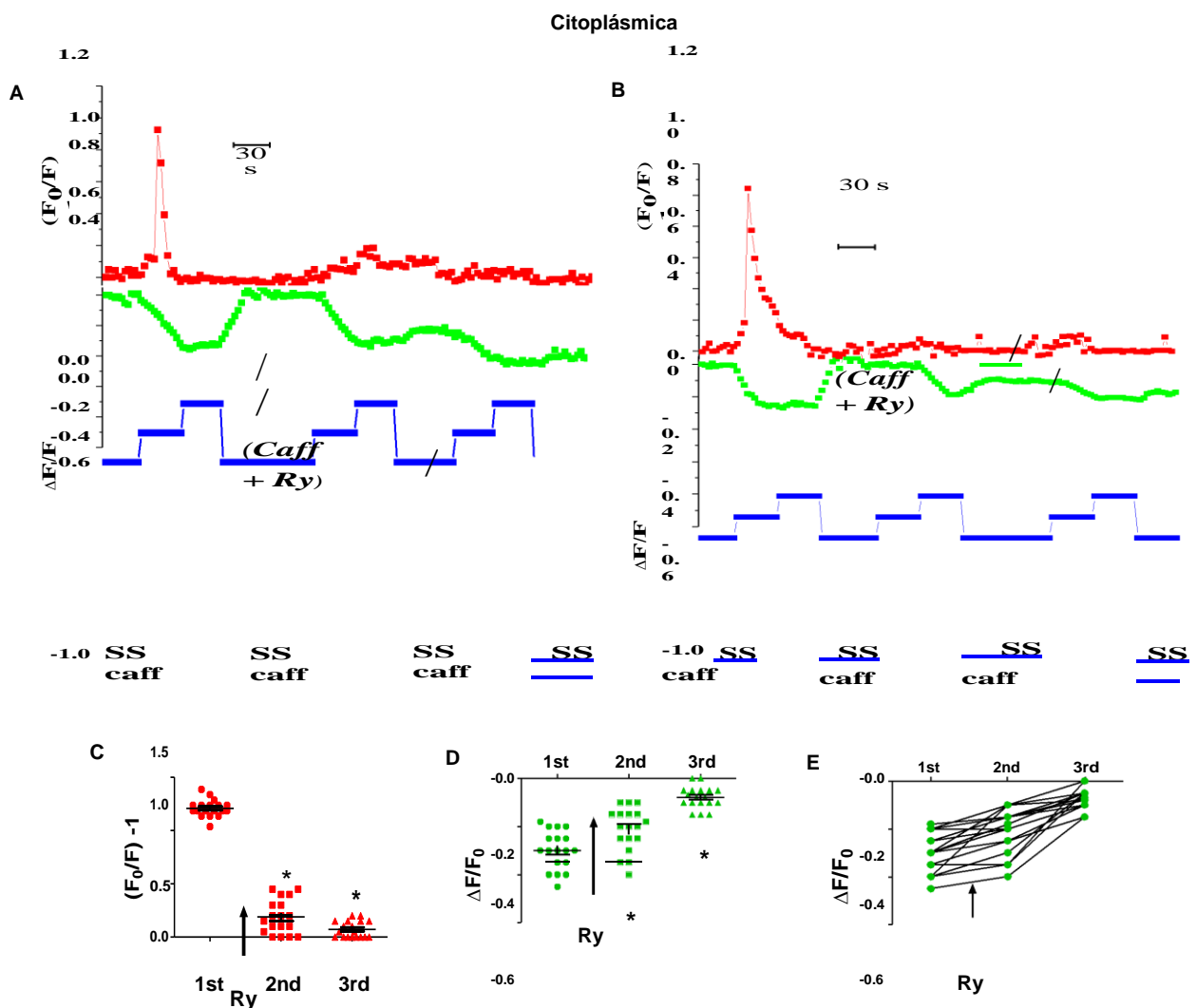


Figura 8.7. Efecto de la aplicación de Rianodina (Ry 100 μ M) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región citoplásmica. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y de la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al

estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de Rianodina. C) Pico de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$, para los tres pulsos de cafeína. D) y E) Reducción de la señal Mag-fluo-4 al final de la aplicación de los tres pulsos de cafeína. n = 18 ROIs, N = 6 células, *P <0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera de las respuestas de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

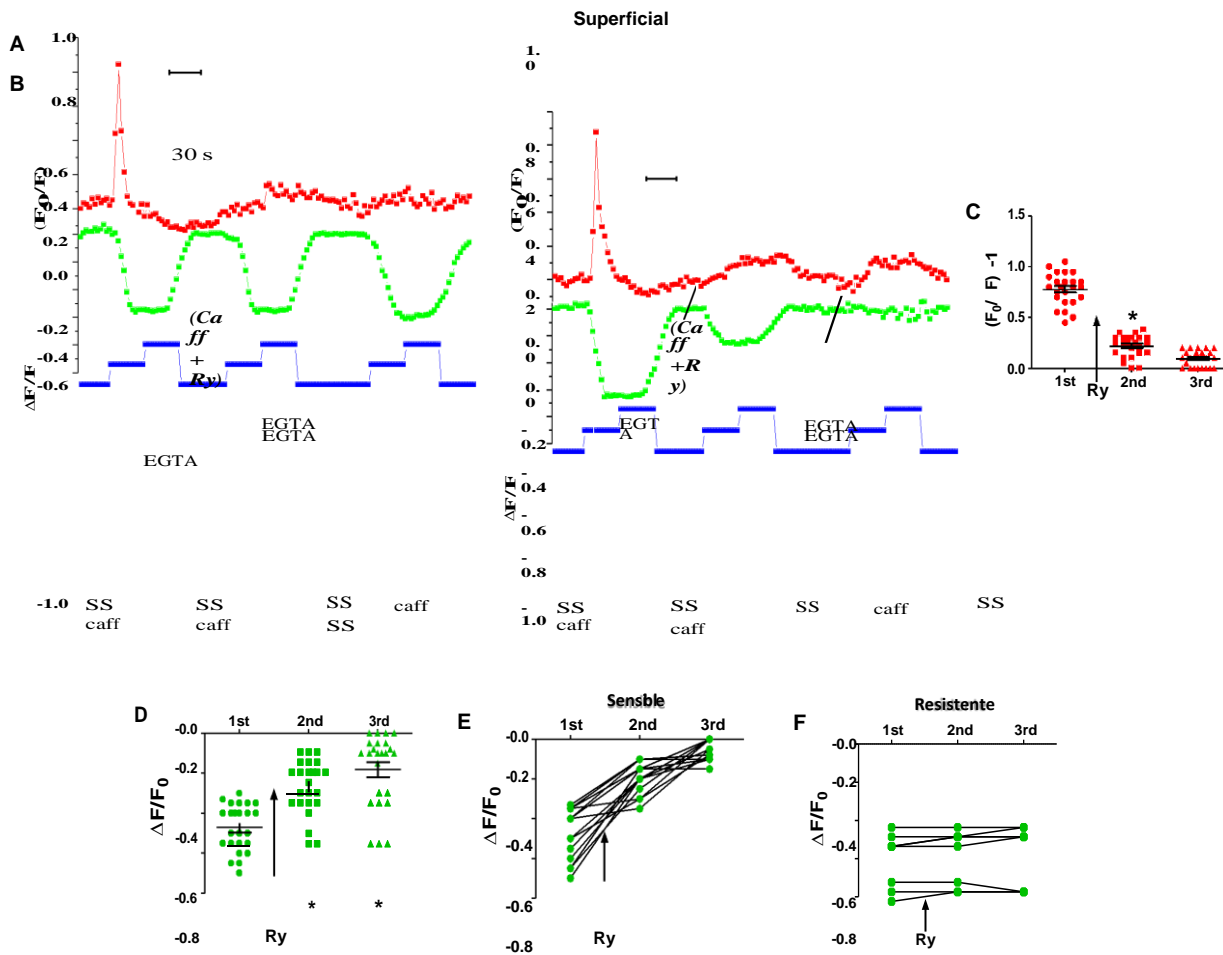


Figura 8.8. Efecto de la aplicación de Rianodina (Ry 100 μ M) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región superficial. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de Rianodina C) Pico de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$, para los tres pulsos de cafeína. D) Reducción de la señal Mag-fluo-4 al final de la aplicación de los tres pulsos de cafeína. E) ROIs sensibles a rianodina n = 18 ROIs F) ROIs resistentes a Rianodina, n = 6 ROIs. n_T = 24 ROIs, N = 6 células, *P < 0.05 prueba t de student pareada, usando la primera respuesta de Ca²⁺, inducida por cafeína, como referencia.

8.4 Efecto de la tapsigargina en el calcio citoplásmico y en el luminal, reportados por Fura-Red y Mag-Fluo-4, respectivamente.

El RS es recargado con Ca²⁺ como resultado de la actividad de la bomba SERCA, con el objetivo de determinar el origen de las respuestas a cafeína, es decir, si todos los transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$ y el cambio de la $[Ca^{2+}]_L$ se originaban del RS, se aplicó, después del primer pulso de cafeína, durante la pausa de los 5 minutos, la

combinación de 1 μM de TG y 20 mM de cafeína, el primero es un inhibidor selectivo y prácticamente irreversible de la bomba SERCA, por lo que nos permite determinar si los depósitos reportados por el Mag-Fluo-4, localizados en las diferentes regiones submembranales, son rellenos por la bomba SERCA y por lo tanto corresponden al RS y además, definir la participación de esta fuente de Ca^{2+} en el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Se observó que la aplicación de TG inhibió fuertemente la amplitud de la respuesta a cafeína en el Ca^{2+} intracelular reportado por el fura-red; éste fue el caso en las tres regiones subcelulares, tanto el segundo como el tercer pulso de cafeína (Figuras 8.9, 8.10 y 8.11). Sin embargo, la señal de Mag-Fluo-4 presentó dos tipos de diferentes respuestas, según la región; en la región perinuclear, la TG inhibió por completo la recuperación de la señal en todos los ROIs analizados, sugiriendo que en esta región se encuentran mayoritariamente depósitos de Ca^{2+} parecidos al RS debido a la sensibilidad presentada a la TG y por lo tanto el mecanismo de captura de Ca^{2+} es mediante la bomba SERCA (Figura 8.9 panel A y C).

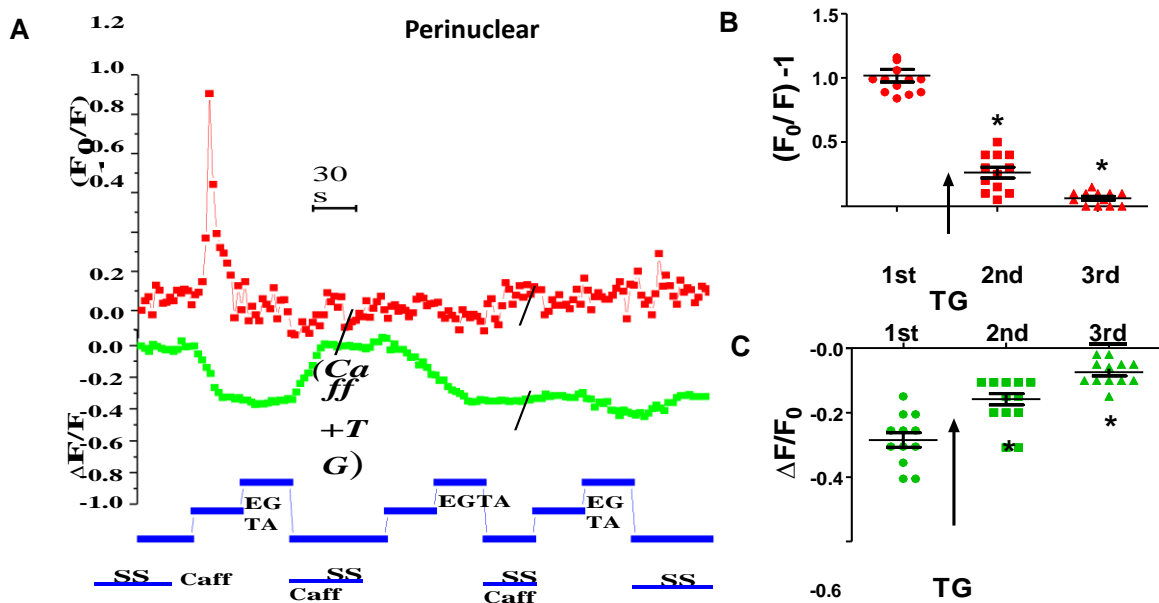


Figura 8.9. Efecto de la aplicación de tapsigargina (TG) en las respuestas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y Ca^{2+} luminal inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) Registro representativo de las respuestas de Ca^{2+} intracelular (trazo rojo) y Ca^{2+} luminal (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de TG. B) Pico de las respuestas de Ca^{2+} intracelular, inducidas por cafeína, para los tres estímulos. C) Reducción máxima de la señal de Mag-fluo-4 básicamente al final de la aplicación de cafeína para los tres pulsos diferentes. $n = 5$ células con 3 ROIs por célula, * $P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} inducida por cafeína, como referencia.

En la región citoplásmica se presentaron dos comportamientos diferentes en lo que respecta a la recuperación de la señal de Mag-Fluo-4, por un lado, se evidenciaron regiones resistentes a TG (Figuras 8.10 panel A y F) y por otro, regiones sensibles a este inhibidor de la bomba SERCA (Figuras 8.10 panel B y E). Es importante mencionar

que se encontró el siguiente patrón de respuestas, los ROIs de Mag-Fluo-4 de alta intensidad fueron totalmente resistentes a TG (Figuras 8.10-A y 8.10-F), mientras que los ROIs de baja intensidad de fluorescencia fueron inhibidos por TG (Figuras 8.10-B y

8.10-E). Esto se puede apreciar en la tercera aplicación de cafeína porque TG inhibió completamente la reducción de la $[Ca^{2+}]_L$ inducida por cafeína, pero sólo en la mitad de los ROIs citoplasmáticos (Figura 8.10-D). El análisis detallado de estos ROIs mostró que los pixeles tenían la misma intensidad, y que la diferencia era el número de pixeles brillantes en cada ROI, siendo el número de pixeles más grande en los ROIs que fueron resistentes a la TG.

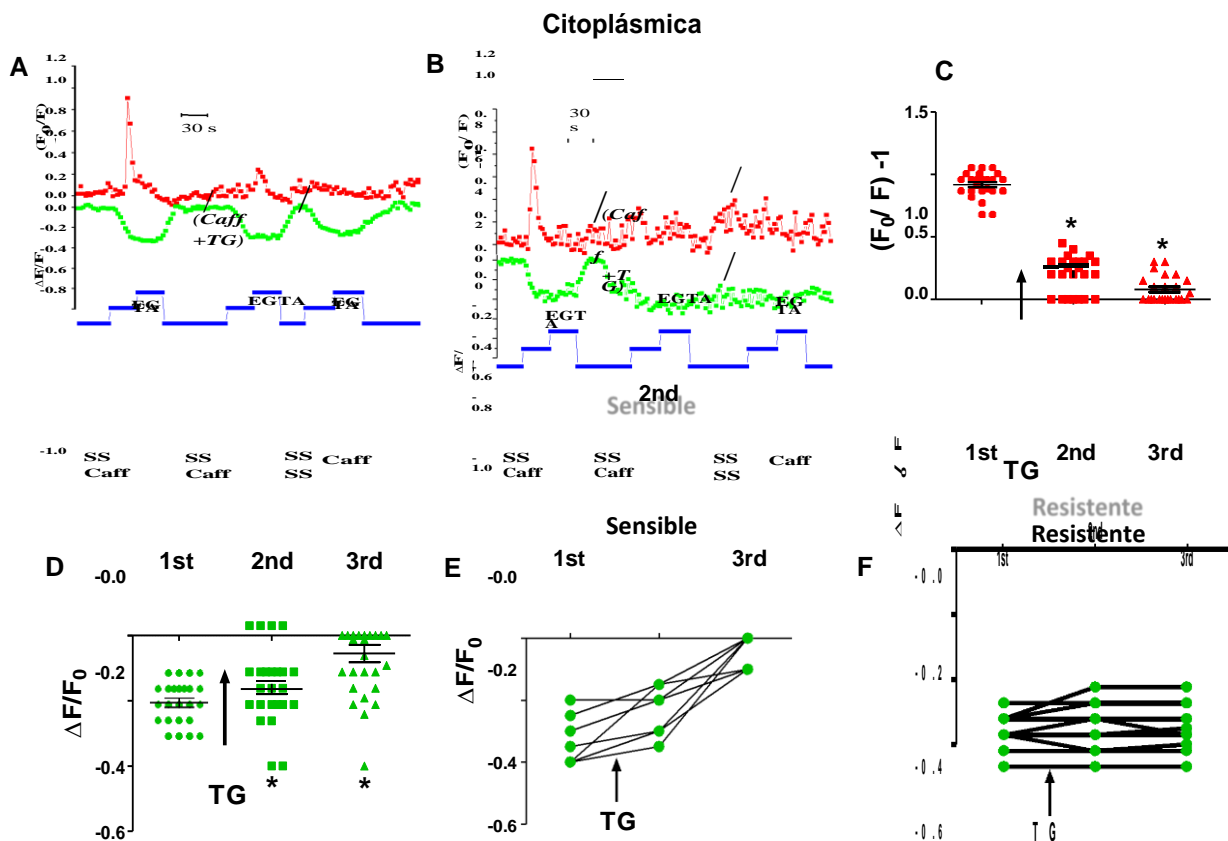


Figura 8.10. Efecto de la aplicación de tapsigargina (TG) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y del Ca^{2+} luminal inducidas por cafeína, en la región citoplásmica. A) ROI representativo de Mag-Fluo-4 con alta fluorescencia, estos fueron refractarios al efecto de la TG (trazo verde), aunque la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ fue totalmente inhibida (trazo rojo). B) ROI representativo con poca intensidad de Mag-Fluo-4 que es sensible a TG (trazo verde). C) Inhibición de los transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$. D) Dos diferentes tipos de efectos de la TG en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína. E) ROIs con baja fluorescencia de Mag-Fluo-4 fueron sensibles a tapsigargina (n = 12). F) ROIs con Mag-Fluo-4 de alta intensidad fueron resistentes a tapsigargina (n = 12). N = 4 células con 6 ROIs por célula, *P<0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} inducida por cafeína como referencia.

Finalmente, en la región superficial el efecto de TG presentó también respuestas heterogéneas, en el Ca^{2+} luminal. Hubo ROIs donde se observó claramente depósitos sensibles a TG y también se encontraron ROIs que fueron claramente resistentes a TG, mientras que algunos ROIs mostraron un efecto mixto, parcialmente sensible y parcialmente resistente, probablemente debido a que ambos depósitos caben dentro de un mismo ROI (Figura 8. 11).

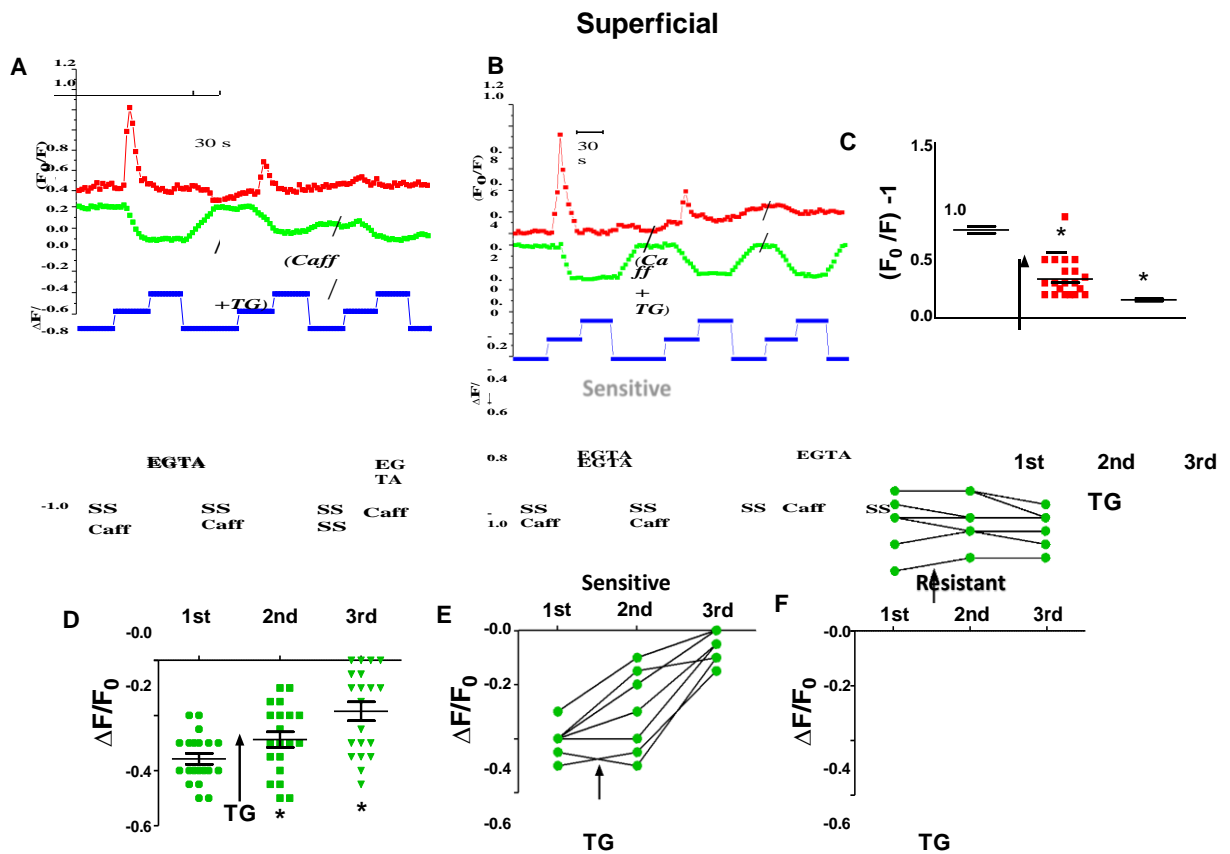


Figura 8.11. Efecto de la aplicación de tapsigargina (TG) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y del Ca^{2+} luminal inducidas por cafeína, en la región superficial. A) ROI representativo que contiene el depósito sensible a TG (trazo verde), mientras la respuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ está inhibida (trazo rojo). B) ROI representativo resistente a TG (trazo verde), sin embargo, el transitorio de la $[Ca^{2+}]_i$ sí está inhibido. C) Respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ en los tres pulsos de cafeína. D) Dos diferentes tipos de efectos de la TG en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína. E) ROIs sensibles a tapsigargina (n = 11). F) ROIs resistentes a tapsigargina (n = 9). N = 4 células con 5 ROIs por célula, *P<0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} inducida por cafeína como referencia.

8.5 Uso de la bafilomicina y del cloruro de amonio (NH_4Cl) para identificar otro mecanismo de captura de Ca^{2+} de los depósitos insensibles a tapsigargina.

Con la finalidad de identificar el mecanismo de captura de calcio presente en los depósitos de Ca^{2+} que fueron resistentes a la tapsigargina, las células fueron tratadas con 100 nM de bafilomicina (inhibidor de la ATPasa de protones) más cafeína, durante la primera pausa de 5 min. Esto con la idea de que los dos principales depósitos intracelulares de Ca^{2+} son el RS y los depósitos ácidos, en éste el mecanismo de

acumulación de Ca^{2+} depende del gradiente de protones. Un ejemplo de este tipo de depósito serían los lisosomas (Xu et al. 2012).

La respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por la cafeína mostró una pequeña, pero significativa, disminución debido a la aplicación de bafilomicina en todas las regiones subcelulares estudiadas (Figuras 8.12, 8.13 y 8.14), sugiriendo que estos depósitos a

los que nombramos “ácidos”, debido a que requieren de la bomba de protones para ser rellenos, se encuentran presentes en todas las regiones subcelulares, aunque aportan muy poco Ca^{2+} al citoplasma en respuesta a la cafeína. Esto se puede concluir cuando se compara el efecto de la TG, la cual inhibió completamente el transitorio de Ca^{2+} , con el de la bafilomicina que sólo lo hizo en una pequeña fracción. Con respecto al efecto en la $[\text{Ca}^{2+}]_L$, ésta no se vio grandemente afectada por la bafilomicina, sin embargo, en el tercer pulso de cafeína se observó una ligera pero significativa disminución de la caída de la señal de Mag-Fluo-4, indicando que una pequeña porción de los depósitos que están cercanos al núcleo, son de naturaleza ácida (Figura 8.12-C).

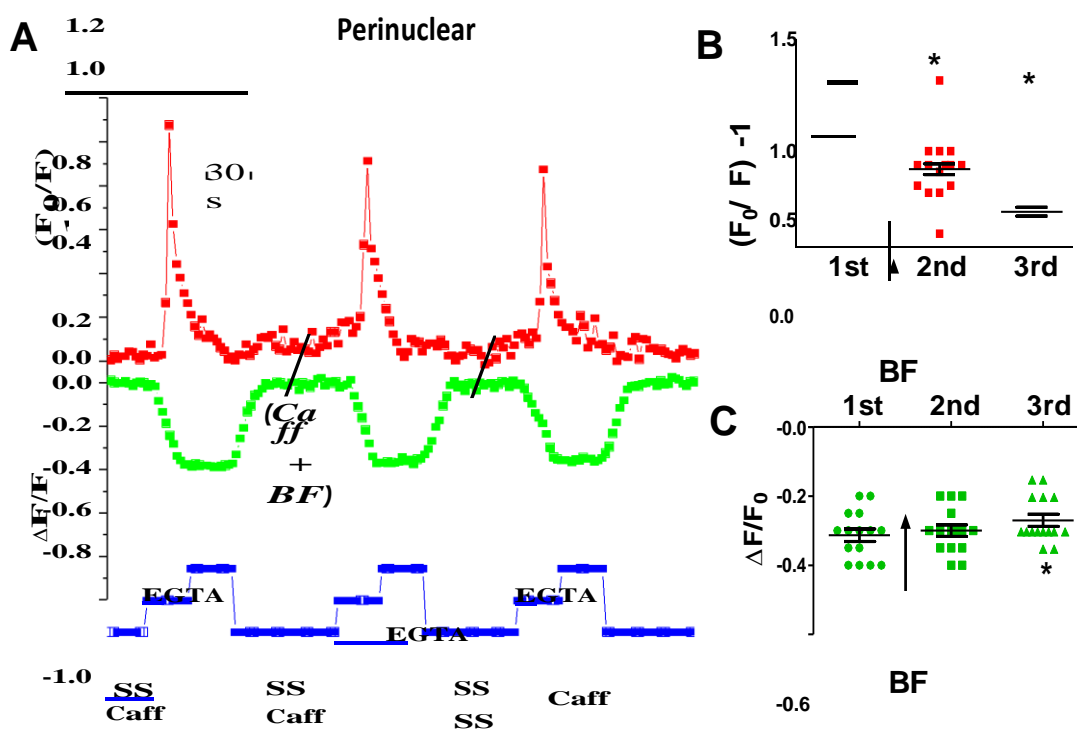


Figura 8.12. Efecto de la aplicación de bafilomicina (BF) en las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) Registro representativo de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de BF. B) Amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, para los tres diferentes pulsos de cafeína. C) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. N = 5 células con 3 ROIs por célula, *P < 0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

Como se mostró anteriormente, algunos de los depósitos de la región citoplásmica y otros de la superficial mostraron cierta resistencia a la TG (Figura 8.10 y

8.11), por ello el interés de conocer si en estas regiones, existen depósitos "ácidos", sensibles a bafilomicina. La aplicación de este inhibidor también disminuyó el transitorio de Ca^{2+} en la región citoplásmica (Figura 8.13-C) y con respecto a la respuesta de la

[Ca²⁺]_L reportado por el Mag-Fluo-4, se observó lo contrario a lo que se mostró con la aplicación de tapsigargina, ya que los ROIs que tenían alta intensidad de fluorescencia fueron los que mostraron inhibición por bafilomicina (Figura 8.13-A y E), mientras que los ROIs con poca intensidad fueron resistentes a bafilomicina (Figura 8.13-B y F). Sugiriendo que en esta región existen dos depósitos, los que tienen poca intensidad de Mag-Fluo-4 que son el RS y los de alta intensidad son los llamados depósitos “ácidos”.

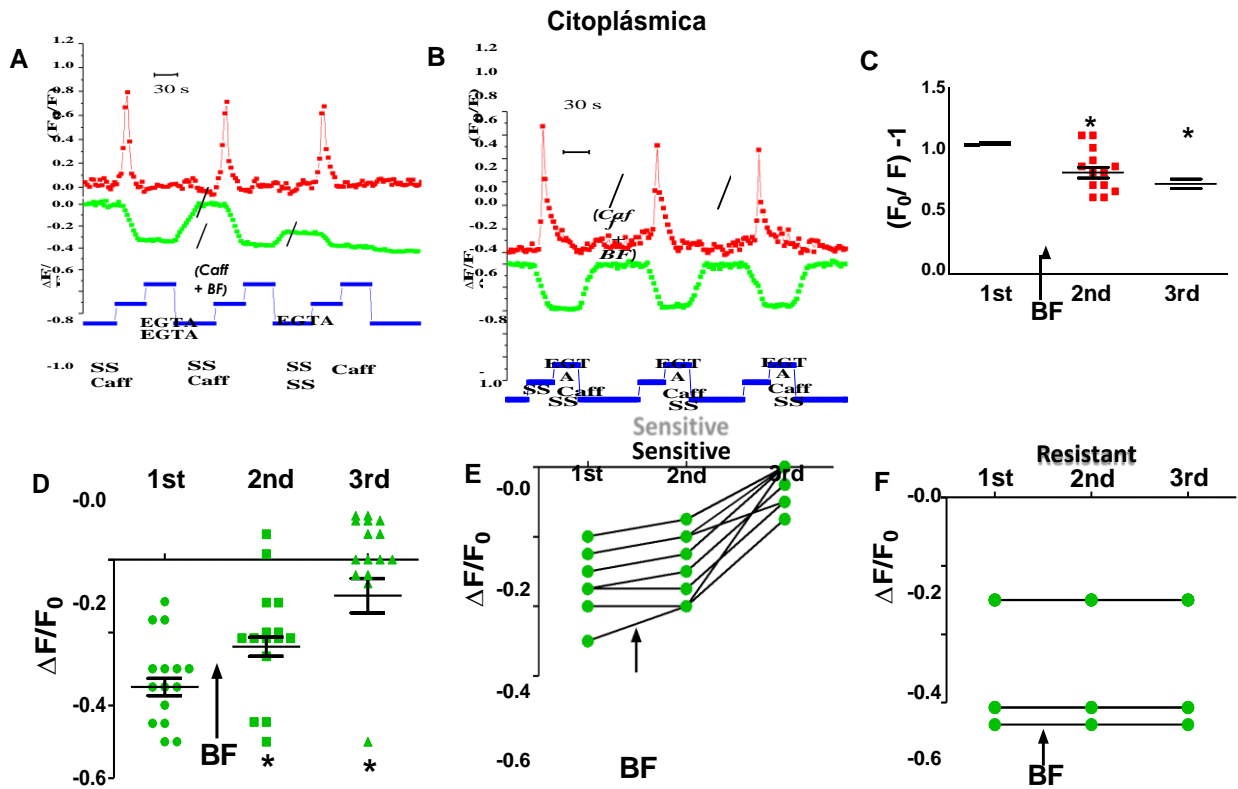


Figura 8.13. Efecto de la aplicación de bafilomicina (BF) en las respuestas de la [Ca²⁺]_i y del Ca²⁺ luminal inducidas por cafeína, en la región citoplásmica. A) ROI representativo que contiene el depósito insensible a BF (trazo verde), con baja intensidad de Mag-Fluo-4 B) ROI sensible a BF (trazo verde), con alta fluorescencia de Mag-Fluo-4. C) Amplitud de las respuestas de la [Ca²⁺]_i intracelular inducida por cafeína. D) Dos diferentes efectos de la BF en las respuestas de la [Ca²⁺]_L inducidas por cafeína. E) ROIs con Mag-Fluo-4 con alta fluorescencia que son sensibles a la BF (n = 9 ROIs). F) ROIs con poca fluorescencia de Mag-Fluo-4 que muestran resistencia a BF (n = 7 ROIs, cuatro no se pueden distinguir porque tienen la misma amplitud). N = 4 células con 4 ROIs por célula. *P < 0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca²⁺ inducida por cafeína como referencia.

Finalmente, la región superficial también mostró ese mosaico de diferentes sensibilidades a bafilomicina en una misma célula (Figura 8.14), sugiriendo una vez

más que esta región tiene presentes ambos depósitos, el RS y los depósitos ácidos, pero que se traslapa en un mismo ROI.

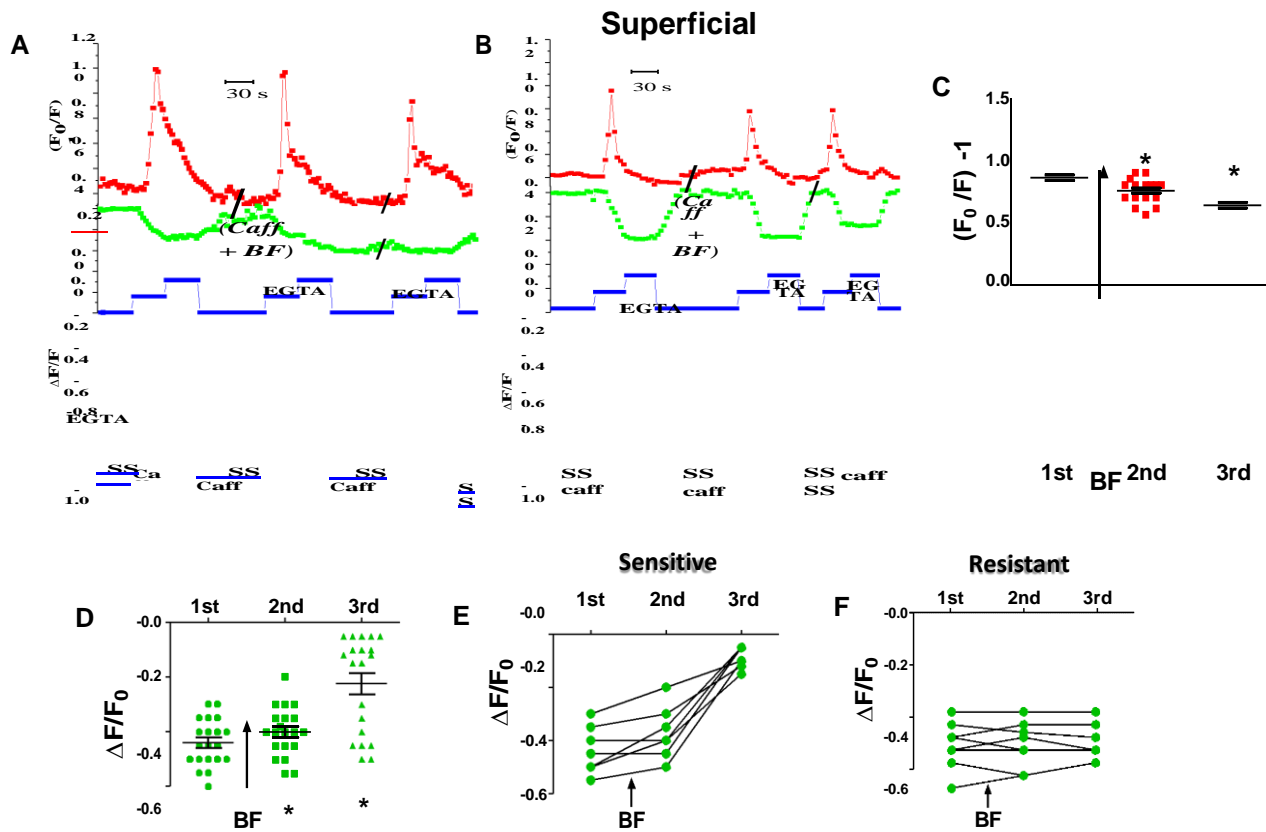


Figura 8.14. Efecto de la aplicación de bafilomicina (BF) en las respuestas de $[Ca^{2+}]_i$ y de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región superficial. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de BF. C) Pico de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$, para los tres diferentes pulsos de cafeína. D) La aplicación de BF mostró dos diferentes efectos en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína. E) ROIs con Mag-Fluo-4 que son sensibles a la BF (n = 12 ROIs). F) ROIs que muestran resistencia a la BF (n = 8 ROIs). N = 4 células con 5 ROIs por célula. *P < 0.05 prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} inducida por cafeína como referencia.

Otro enfoque para abordar la presencia de depósitos “ácidos” de Ca^{2+} es inhibir la captación de Ca^{2+} por la alcalinización del lumen con NH_4Cl (Christensen et al. 2002). Una breve exposición de las células a 18 mM de NH_4Cl produjo, en todas las regiones analizadas, una pequeña pero significativa inhibición en las respuestas de Ca^{2+} intracelular (Figuras 8.15-8.17), esto fue similar a lo observado con bafilomicina. Por otro lado, se observó una clara inhibición de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$ pero sólo en una fracción de los ROIs de las regiones citoplásmicas y superficiales (Figuras 8.16-B y

8.17-B) pero no en la región perinuclear (Figura 8.15).

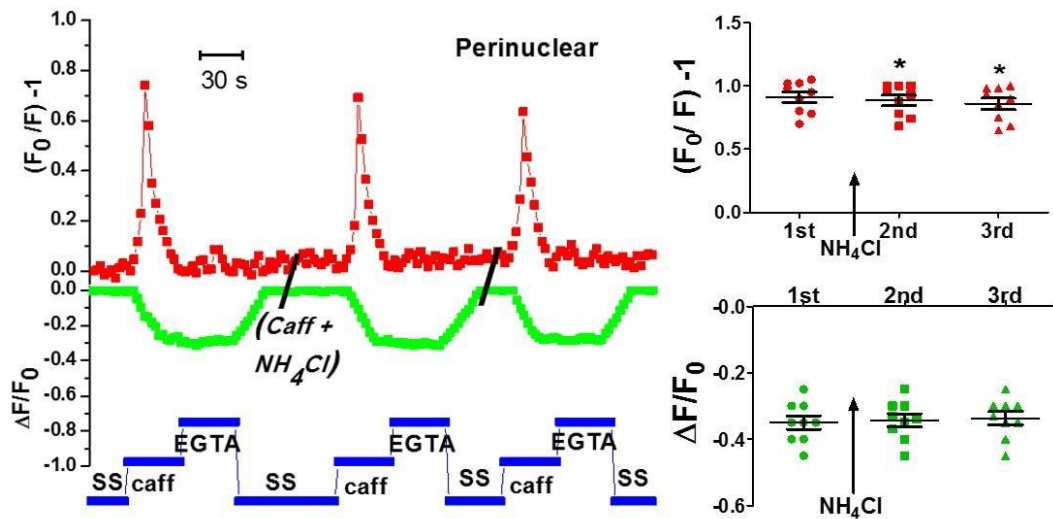


Figura 8.15. Efecto de la aplicación de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) en las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) Registro representativo de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de 18 mM de NH_4Cl . B) Amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para los tres diferentes pulsos de cafeína. C) Reducción de la señal Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. $N = 3$ células con 3 ROIs por célula, * $P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

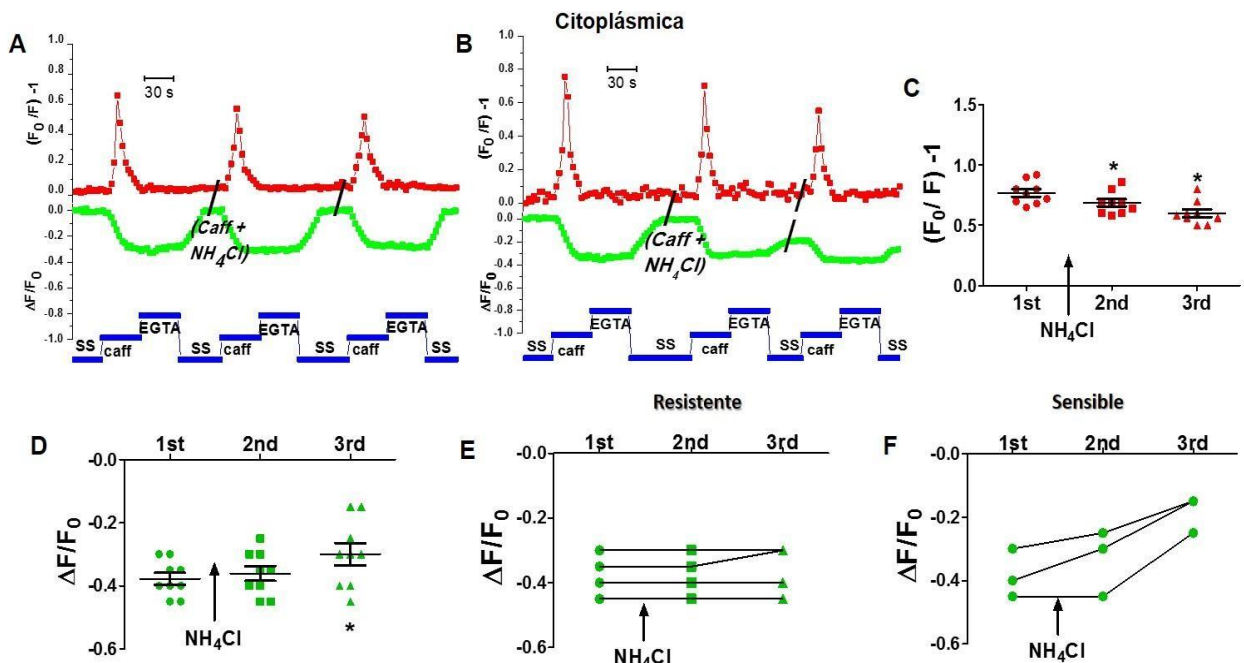


Figura 8.16. Efecto de la aplicación de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) en las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región citoplásmica. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de 18 mM de NH_4Cl . C) Amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para los tres diferentes pulsos de cafeína. D) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína E) ROIs resistentes al NH_4Cl , ($n = 6$) F) ROIs sensibles al NH_4Cl , ($n = 3$). $n = 9$ ROIs en total, 3 células, * $P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

Una diferencia importante es que el efecto del NH_4Cl fue totalmente reversible en 20 minutos, ya que con las aplicaciones subsiguientes de cafeína se obtuvo una respuesta similar a la del control, lo que no fue el caso con la bafilomicina A1, lo cual concuerda con lo reportado de que este inhibidor es irreversible (Yoshimori et al. 1991; Gekle et al. 1995).

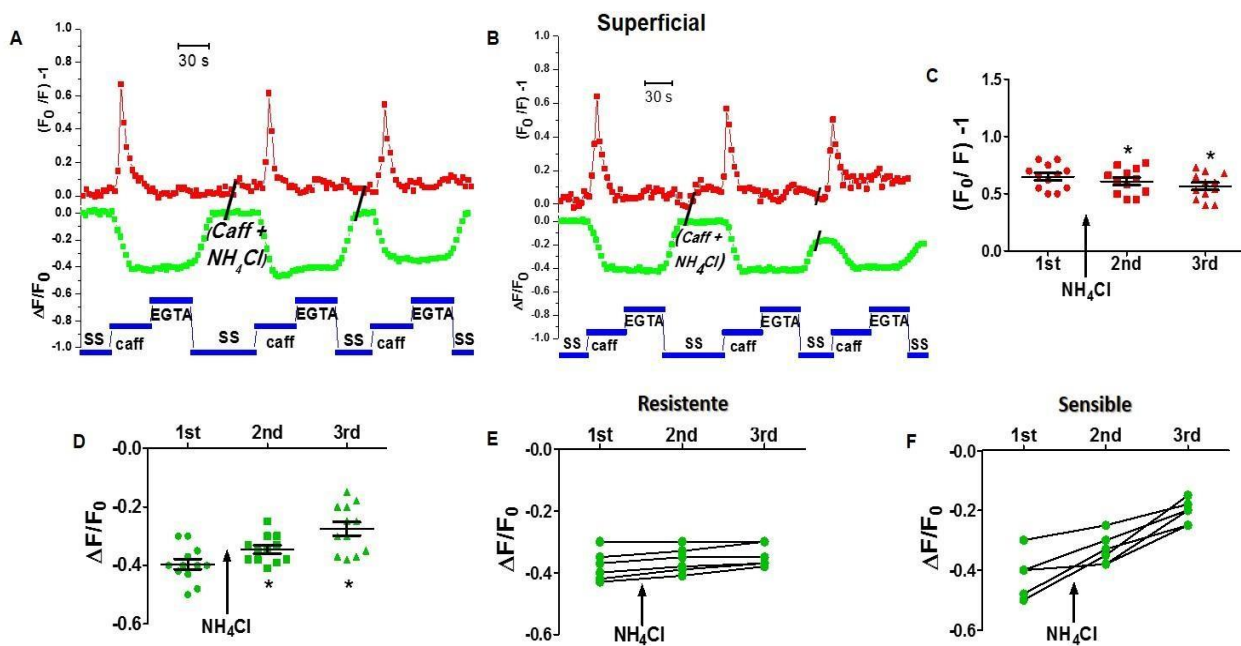


Figura 8.17. Efecto de la aplicación de Cloruro de Amonio (NH_4Cl) en las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región superficial. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de 18 mM de NH_4Cl . C) Amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para los tres diferentes pulsos de cafeína. D) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. E) ROIs resistentes al NH_4Cl , ($n = 6$). F) ROIs sensibles al NH_4Cl , ($n = 6$). $n = 12$ ROIs en total, 3 células, * $P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

8.6 Efecto de la combinación de bafilomicina y tapsigargina para determinar si existe un tercer tipo de depósito intracelular de Ca^{2+} .

Con el objetivo de saber, si sólo existen dos mecanismos de captura de Ca^{2+} y por lo tanto dos depósitos diferentes, se aplicó, durante la pausa de 5 minutos, la combinación de cafeína junto con tapsigargina y bafilomicina, después del primer pulso de cafeína, esto con el fin de inhibir a la bomba SERCA y a la ATPasa de protones. Como era de esperarse la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se vio totalmente inhibida en todas las

regiones de la célula (Figura 8.18, 8.19 y 8.20), esto sugiere, junto con los datos anteriores, que el depósito principal que aporta Ca^{2+} al citoplasma es el RS y que los depósitos ácidos realmente aportan muy poco Ca^{2+} debido a su baja capacidad de amortiguar este ion.

Por otra parte, se observó una fuerte inhibición de la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ en la región perinuclear, revelando que, en esta región, como ya se había comentado antes, se encuentra principalmente el RS y algunos depósitos ácidos (Figura 8.18-C).

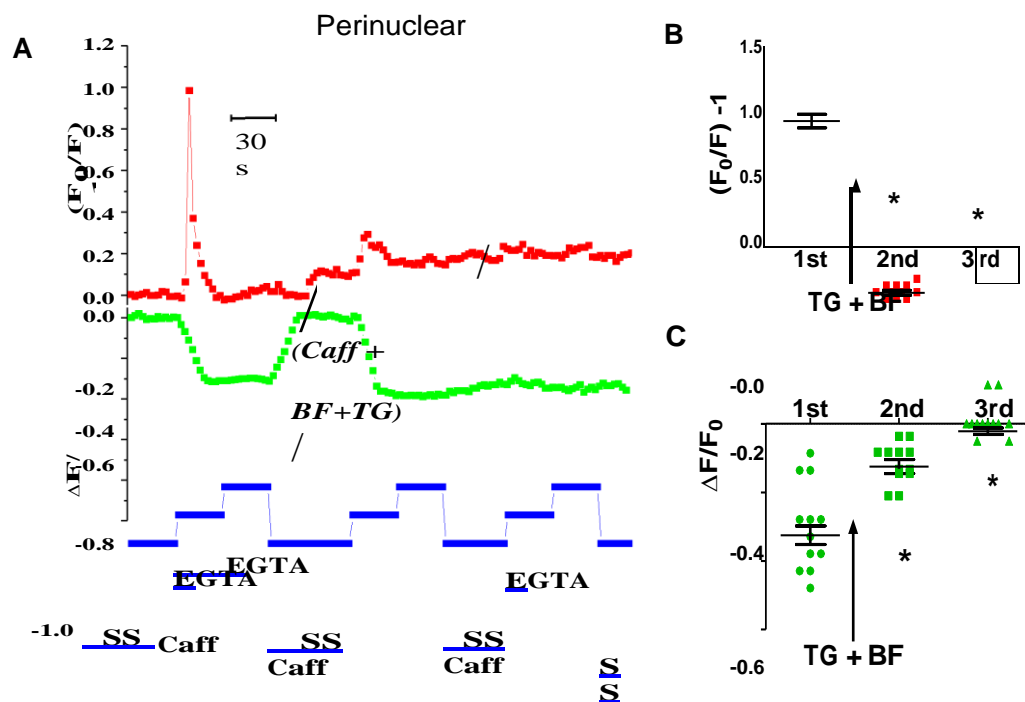


Figura 8.18. Efecto de la aplicación conjunta de BF más TG, en las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) Registro representativo de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de BF + TG. B) Amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, para los tres pulsos de cafeína. C) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. $n = 12$ ROIs, $N = 4$ células, $*P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

Al igual que la región perinuclear, la región citoplásmica en ambas respuestas ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ y $[\text{Ca}^{2+}]_L$) se vieron fuertemente inhibidas por la combinación de bafilomicina y thapsigargina (Figura 8.19), concluyendo que en esta región existen en su mayoría, dos

depósitos de Ca^{2+} ; por un lado, uno que es dependiente de la bomba SERCA y el otro dependiente de la ATPasa vacuolar de protones.

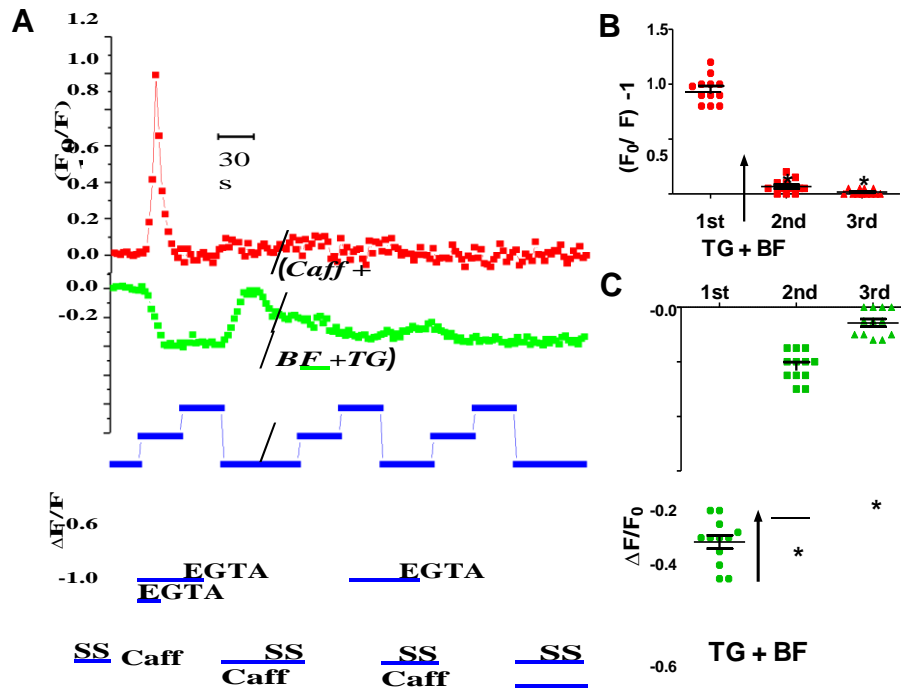


Figura 8.19. Efecto de la aplicación conjunta de BF más TG, en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región perinuclear. A) Registro representativo de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de BF + TG. B) Amplitud de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ para los tres pulsos de cafeína. C) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. $n = 12$ ROIs, $N = 4$ células * $P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

En cuanto a la región superficial, se observó que en algunos de los ROIs (aproximadamente el 25%) la respuesta a cafeína en la $[Ca^{2+}]_L$ no se inhibió (Figura 8.20-F), esto sugiere que existe un tercer mecanismo de captura de Ca^{2+} cerca de la membrana plasmática y por ende un tercer tipo de almacén intracelular de este ion, el cual sería sensible a la cafeína y acumularía Ca^{2+} por un mecanismo desconocido que no involucra a la bomba SERCA, ni a la bomba de protones.

Con el fin de evaluar si el tercer depósito, que fue más evidente en la región superficial (ver Figura 8.20), y que es insensible a TG y BF, está el RyR o un canal activado por cafeína, se pre-incubaron las células con $1 \mu M$ de TG y $100 nM$ de BF por diez minutos, antes de cualquier estímulo. Después del tiempo de pre-incubación se

utilizó el protocolo del triple pulso de cafeína, donde después del primer pulso de cafeína se aplicó 100 μ M de rianodina (Figura 8.21).

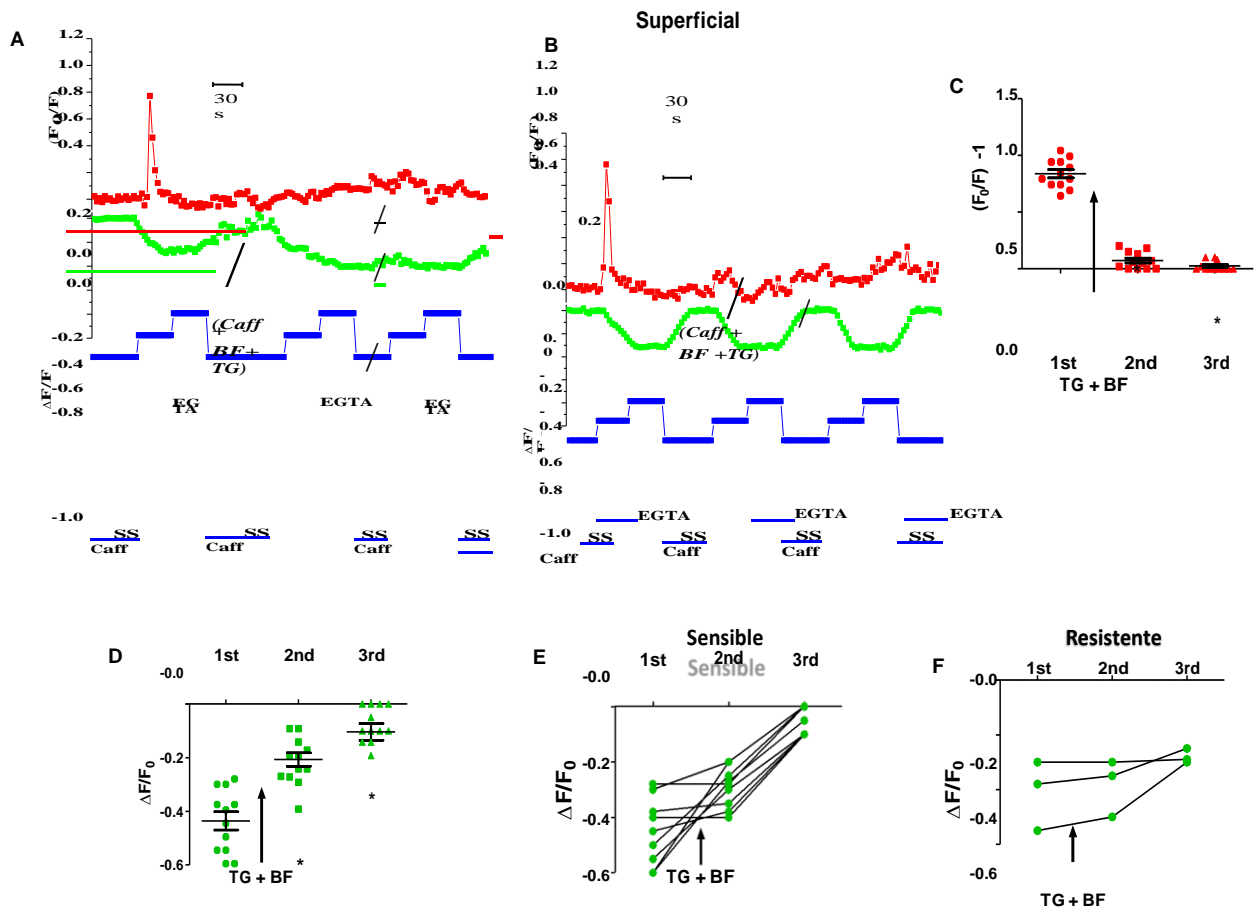


Figura 8.20. Efecto de la aplicación conjunta de BF más TG, en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, en la región superficial. A) y B) Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de BF + TG. C) Amplitud de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ para los tres pulsos de cafeína. D) Reducción de la señal de Mag-fluo-4 al final de la aplicación de cafeína. E) ROIs sensibles a la combinación de tapsigargina más bafilomicina, $n = 9$ F) ROIs resistentes a la combinación de los inhibidores $n = 3$. $n = 12$ ROIs, $N = 4$ células, $*P < 0.05$ prueba t de Student pareada, usando la primera respuesta de Ca^{2+} , inducida por cafeína, como referencia.

Como era de esperarse la aplicación crónica de TG y BF, inhibió los transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$, en todas las regiones celulares, mientras que en la señal luminal tanto en la región perinuclear, citoplásmica y algunas superficiales se inhibió por completo la recuperación de la $[Ca^{2+}]_L$ (Figura 8.21-A-C), mientras que el depósito que es resistente a TG y BF mostró también resistencia a la rianodina, a pesar de que se presentó respuesta a la cafeína (Figura 8.21-D), sugiriendo que en este tercer depósito no está el RYR, pero más bien lo que pudiera ser un canal sensible a cafeína.

De todos los ROIs analizados en la región superficial, se observó que aproximadamente el 25% era resistente a tapsigargina, bafilomicina y a rianodina (Figura 8.22), esto último consistente con lo encontrado en la figura 8.20, anteriormente descrita.

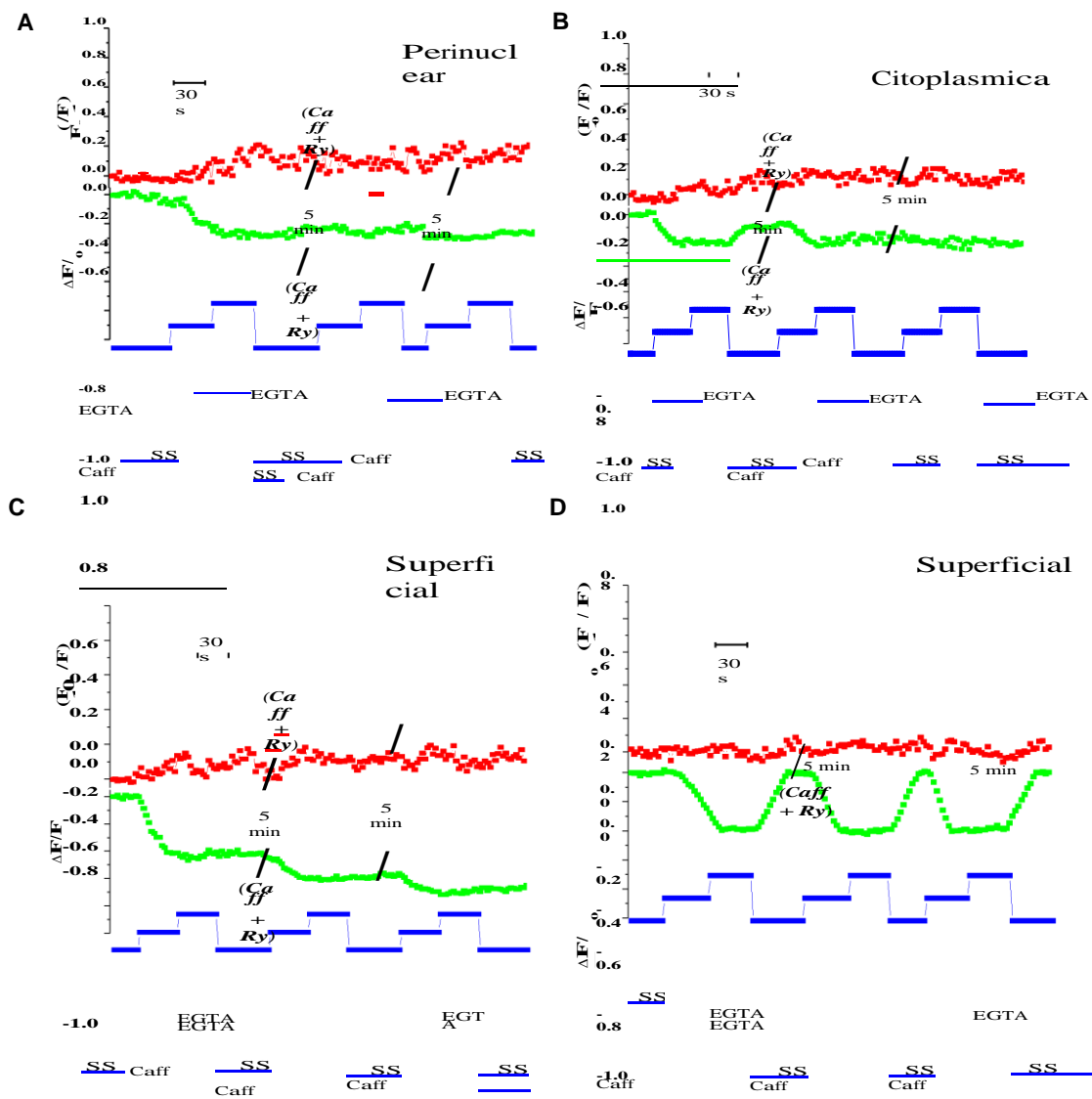
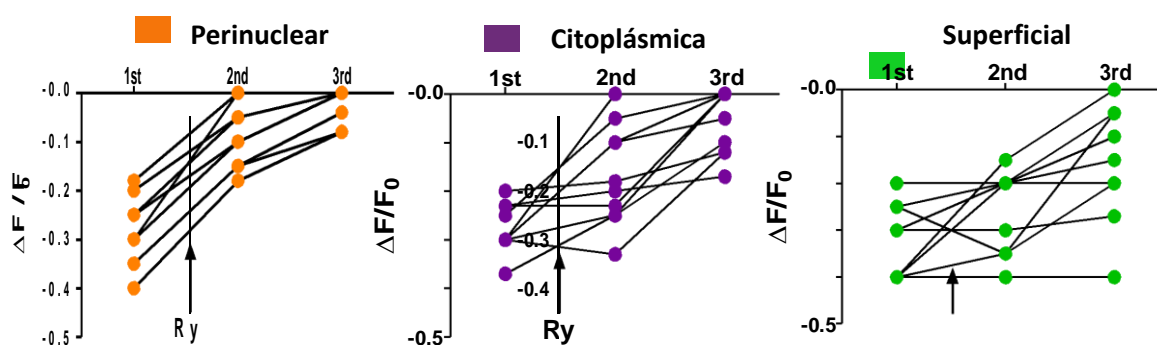


Figura 8.21. Efecto de la pre incubación de tapsigargina y bafilomicina con la subsecuente aplicación de Rianodina (Ry 100 μ M) en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ y $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína. Registros representativos de las respuestas de la $[Ca^{2+}]_i$ (trazo rojo) y la $[Ca^{2+}]_L$ (trazo verde) al estímulo por cafeína antes y después de la aplicación de la Ry. A) En la región perinuclear. B) Región citoplásmica. C y D) Representativos en la región superficial. n = 12 ROIs, en N = 4 células.



Ry

Figura 8.22. Efecto de la pre incubación con tapsigargina y bafilomicina y la subsecuente aplicación de Rianodina (Ry) 100 μ M en las respuestas de la $[Ca^{2+}]_L$ inducidas por cafeína. Se presentan las respuestas en n = 12 ROIs, N = 4 células de diferentes preparaciones, *p<0.05, prueba t de Student pareada, tomando como referencia el primer pulso de cafeína.

8.7 Análisis de colocación del indicador Mag-Fluo-4 con los colorantes para retículo endoplásmico, lisosomas y mitocondria.

Con el objetivo de conocer en que compartimentos intracelulares se encuentra el colorante Mag-Fluo-4, se utilizaron los siguientes indicadores de orgánulos con la finalidad de estudiar su colocación con el indicador de Ca^{2+} ; el ER-Tracker (BODIPY-Texas Red Glibenclamida) como indicador del retículo endoplásmico, Lyso Tracker Red para los lisosomas y Tetrametil Rodamina Etil Ester Perclorato (TMRE) para las mitocondrias.

En el caso del indicador del retículo (ER-Tracker), éste mostró una baja colocación con el Mag-fluo-4 de alrededor del 40% en las regiones tanto citoplásmica como superficial, mientras que en la región perinuclear fue del 60%, (Figura 8.23-D). Esto nos sugiere que la señal de Mag-Fluo-4 que proviene de la región perinuclear. refleja principalmente el depósito de Ca^{2+} contenido en el RS y que además coincide con los resultados obtenidos utilizando taspigargina (ver sección 8.3), que mostraron que dicho inhibidor tiene un efecto preponderante en esta región subcelular.

Por otra parte, se realizaron análisis de los distintos ROIs de la región citoplásmica, donde se observó que el Mag-Fluo-4 no colocó con la señal de ER- Tracker (Figura 8.23-D y 8.23-J), además que la señal del ER-Tracker no colocó con Mag-Fluo-4 (Figura 8.23-I), por lo tanto, en esta región se evidenció una correlación inversa entre la señal del indicador de RE (ER-tracker) y el Mag-Fluo-4 (Figura 8.23-K).

Con respecto a LysoTracker, éste colocó sólo el 35% en la región perinuclear. 25% en la región superficial y el 20% en la citoplásmica. En esta última región, los puntos del LysoTracker no coincidieron con ningún ROI de Mag-Fluo-4 (Figura 8.23-L) sugiriendo que el 20% de colocación podría deberse, en su gran mayoría, a una distribución de carácter aleatorio (alrededor del 10%) y la tamaño tan grande del pixel (Dunn et al. 2011), por lo tanto, en nuestras condiciones de registro, no pudimos detectar la presencia del Mag-Fluo-4 dentro de los lisosomas.

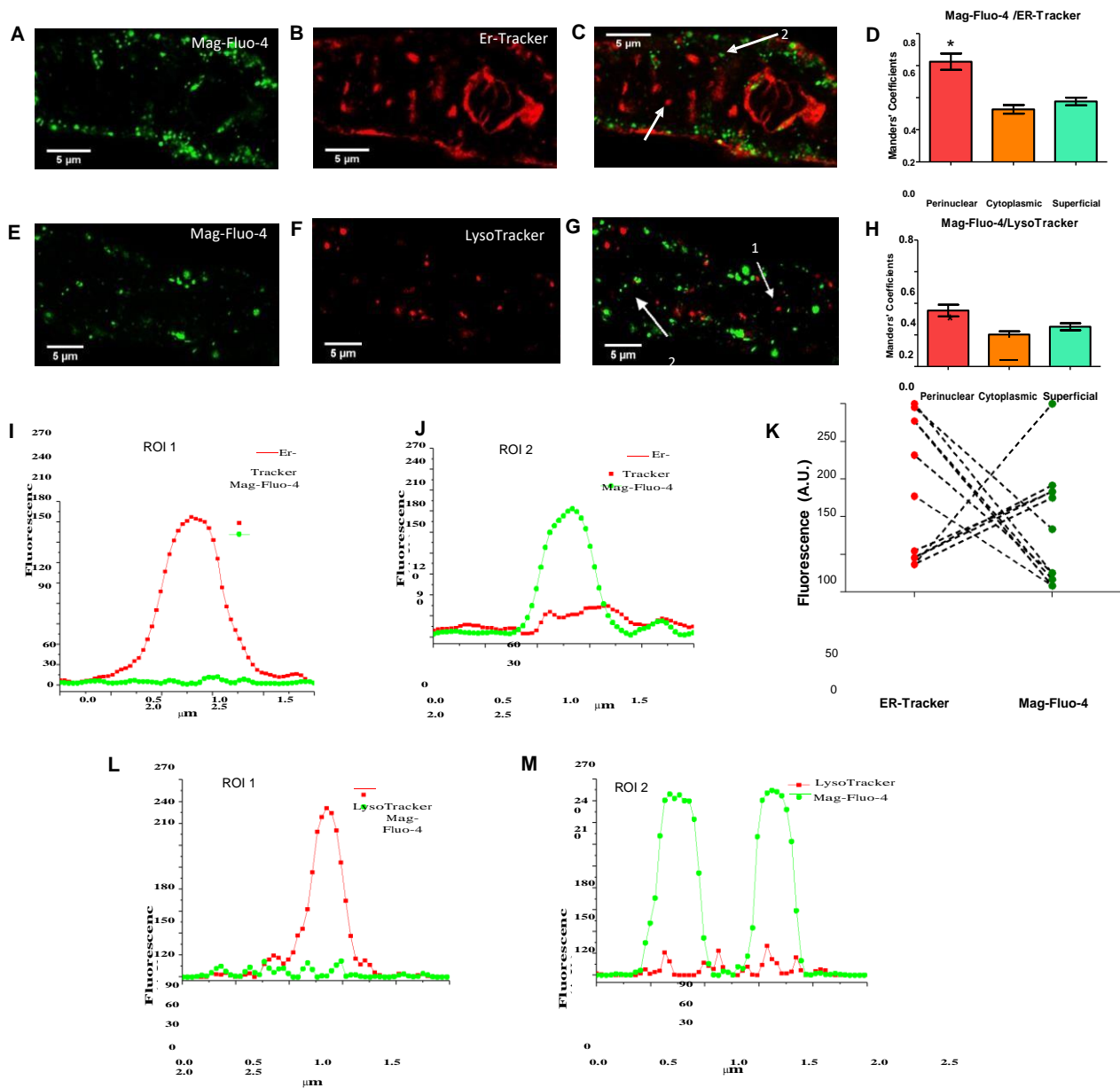


Figura 8.23. Colocalización de Mag-Fluo-4 con ER-Tracker o con LysoTracker. Imagen deconvolucionada de una célula del músculo liso teñida con A) Mag-fluo-4 (señal verde) y B) ER-Tracker (señal roja) C) Fusión de las imágenes mostradas en A y B. D) Colocalización de Mag-Fluo-4 con ER-Tracker en las tres regiones de la célula. Célula de músculo liso teñida con E) Mag-fluo-4 y F) LysoTracker G) Fusión de las imágenes mostradas en los incisos E y F. H) Colocalización de Mag-Fluo-4 con LysoTracker en las tres regiones subcelulares. I) Gráfico representativo de un ROI citoplásmico con alta fluorescencia para ER-Tracker pero con baja fluorescencia para Mag-Fluo-4. J) Gráfico representativo de un ROI citoplásmico con alta intensidad de Mag-Fluo-4 pero con baja de ER-Tracker. K) Análisis de 12 ROIs citoplásmicos en cuatro células diferentes, mostrando la relación inversa entre las intensidades de fluorescencia de Mag-Fluo-4 y de ER-Tracker. L) Gráfico representativo de un ROI citoplásmico con alta fluorescencia para LysoTracker, que no colocaliza con una señal de Mag-Fluo-4. M) Gráfico representativo de un ROI citoplásmico con alta intensidad de Mag-Fluo-4 pero sin señal de LysoTracker. En los análisis de colocalización (coeficiente de Manders), se analizaron 5 células

utilizando 7 ROIs perinucleares, 12 ROIs citoplásmicos y 16 ROIs superficiales. * P <0,05 utilizando ANOVA de una vía y Dunnett usando la región citoplásmica como referencia.

Finalmente, el análisis de colocalización de Mag-Fluo-4 con TMRE (mitocondrias) arrojó que este indicador de Ca^{2+} no coincide con las mitocondrias (Figura 8.24), sugiriendo que el Mag-Fluo-4, en las condiciones de cargado empleadas en este proyecto, no está reportando el cambio en la concentración de la $[\text{Ca}^{2+}]$ mitocondrial.

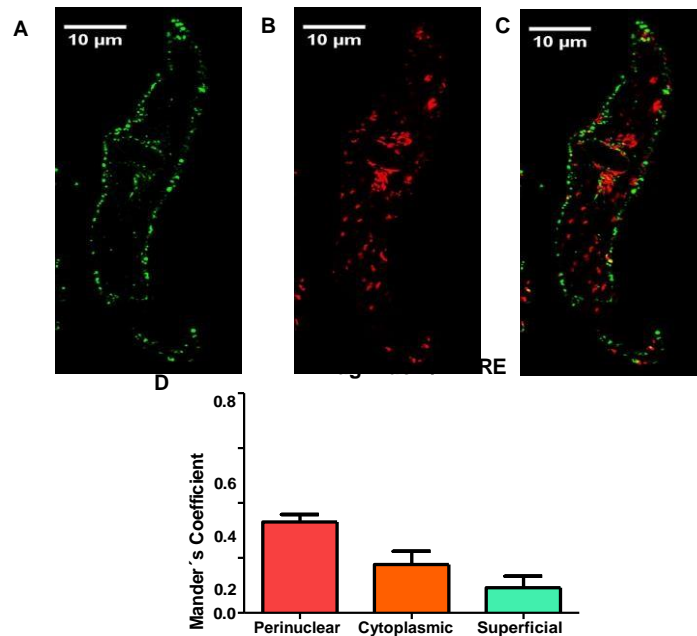


Figura 8.24. Colocalización de Mag-Fluo-4 con el indicador de mitocondrias (TMRE). Imagen deconvolucionada de una célula del músculo liso teñida con A) Mag-Fluo-4 (señal verde) y B) Tetrametil-Rodamina (TMRE) (señal roja) C) Fusión de las imágenes mostradas en los incisos A y B. D) Colocalización de Mag-Fluo-4 con TMRE en las tres regiones de la célula.

8.8 Efecto de la ausencia de Mg^{2+} en la señal del Mag-Fluo-4 en las células de músculo liso.

Debido a que el Mag-fluo-4 es un ácido tricarboxílico puede unir al Mg^{2+} con mayor afinidad que lo haría el Fluo-4 (tetracarboxilato), decidimos estudiar el efecto de este ion divalente en la señal de Mag-Fluo-4. Con este fin se procedió a incubar a las células por una hora con la misma solución salina (SS) pero sin la adición de magnesio (para su composición véase el apartado de soluciones y sustancias), con la finalidad de determinar si los depósitos observados en la región superficial se debían principalmente a este ion divalente.

Los resultados obtenidos mostraron que, al contrario de lo esperado si la señal fuese debida al magnesio, las vesículas con alta señal de Mag-Fluo-4 que se encontraban en la periferia de la célula, aumentaron su señal en ausencia de magnesio. Estos datos sugieren que los compartimentos reportados por el indicador, no parecen ser depósitos de magnesio (Figura 8.25). En el gráfico de la figura 8.25 se observa que la frecuencia de pixeles con una mayor intensidad de fluorescencia (rango de 80-200) aumentó en la célula pre-incubada en solución sin magnesio con respecto al control.

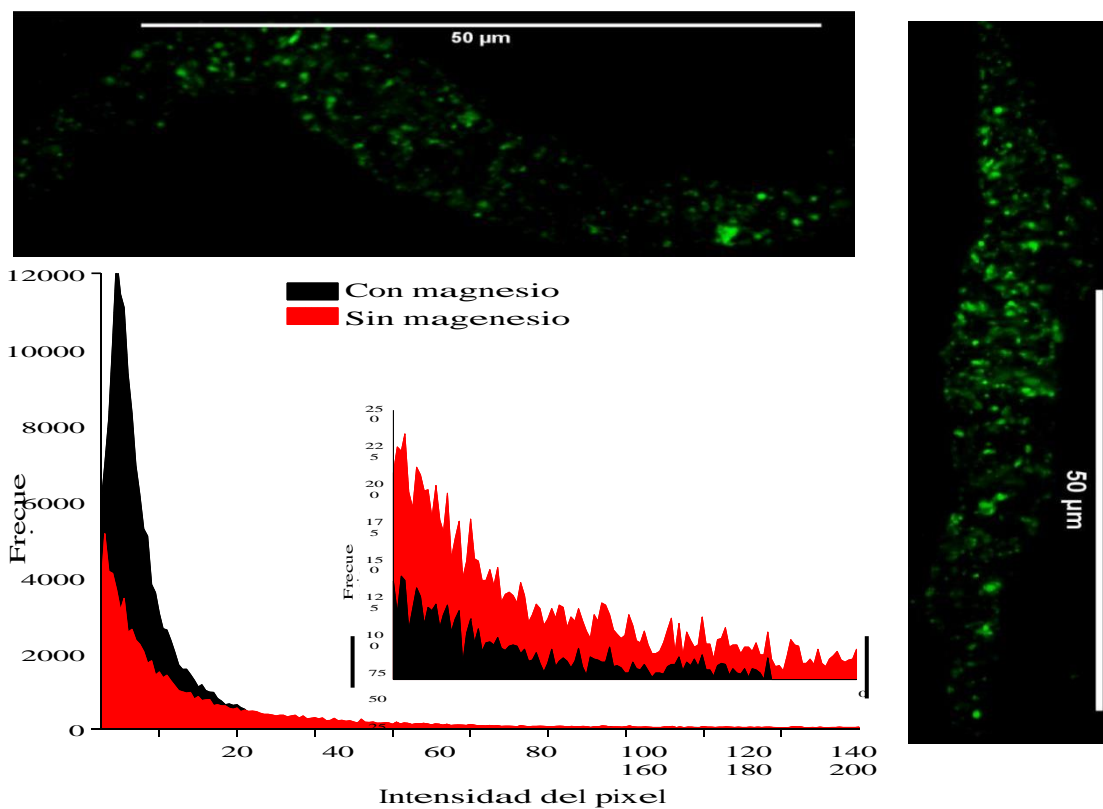


Figura 8.25 Efecto de la incubación de las células en solución salina, con o sin 2 mM de magnesio, en la señal del Mag-Fluo-4. La imagen superior nos muestra una célula incubada con la solución con Mg^{2+} y la imagen de la derecha proviene de una célula que estaba en solución salina carente de magnesio. El histograma muestra cómo la ausencia de magnesio resultó en un incremento de la intensidad de los pixeles (recuadro).

9. DISCUSION

El enfoque que se utilizó en los registros simultáneos de Ca^{2+} en la presente tesis nos permitió una mejor resolución espacial, debido a la exploración por regiones de interés a nivel subcelular, aunque se sacrificó parcialmente la resolución temporal, ya que el tiempo entre cada imagen, fue de 1.98 segundos, lo necesario para observar los transitorios de Ca^{2+} inducidos por cafeína, los cuales son un poco más rápidos en comparación de la reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$, sin embargo, esta resolución temporal no nos permitió la adquisición simultánea de las dos longitudes de onda del Fura-Red, necesarias para obtener los cambios cuantitativos de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por esta razón, sólo se reportó las variaciones cualitativas en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Nuestros datos sugieren que no existe una relación unívoca entre las señales de Mag-Fluo-4 y el Ca^{2+} citoplásmico reportado por el Fura-Red, esto se puede deber a la complejidad de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} donde el Mag-Fluo-4 está localizado. Con respecto a este último indicador, está reportado que se usa ampliamente para estudiar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_L$, tanto del ER (Laude et al. 2005; Gerasimenko & Tepikin 2005; Flourakis et al. 2006; Choi et al. 2006; Myoung et al. 2002) o el RS (Dagnino-Acosta & Guerrero-Hernández 2009; Shmigol et al. 2001b) en diferentes tipos de células. Parece que este indicador de Ca^{2+} tri-carboxílico (ver fórmula en la figura 7.2) se puede incorporar por medio de algún transportador (aún no identificado) en el RE o en el RS y a partir de aquí, debido a la falta de un mecanismo de retención en el RE/RS, el fluoróforo puede emigrar a otros organelos intracelulares (Diercks et al. 2016; Gerasimenko et al. 2014).

Esta aparente limitación de que el indicador no se ubica solamente en un solo tipo de organelo, funcionó a nuestro favor en este estudio, ya que logramos registrar los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ en respuesta a la cafeína tanto en el RS en depósitos ácidos de naturaleza indeterminada y en un tercer depósito que requiere mayor estudio, puesto que lo único que sabemos es que presenta resistencia a bafilomicina, tapsigargina y rianodina.

Los diferentes depósitos intracelulares de Ca^{2+} que se han reportado en diversos tipos celulares, se han caracterizado comúnmente por su sensibilidad a los agentes liberadores de Ca^{2+} , ya sea fisiológicos o farmacológicos (como cafeína, rianodina, tapsigargina, ionomicina, IP_3 , ADPRc, entre otros). Se ha observado en diferentes tipos celulares la existencia de depósitos de Ca^{2+} que son sensibles a IP_3 , tapsigargina y ionomicina (Churchill & Louis 1999; Pizzo et al. 1997), pero en el presente trabajo nosotros utilizamos a la cafeína como agente liberador de los depósitos de Ca^{2+} intracelulares en las células de músculo liso de la vejiga de cobayo y de ahí partimos para conocer los depósitos liberables por este agente farmacológico, hasta ahora descrito como un activador del RyR.

Las respuestas a cafeína se observaron tanto para la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ como para la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; en los diferentes ROIs definidos para las tres regiones subcelulares; éstas fueron la perinuclear, citoplasmática y la superficial. Previamente se ha demostrado que, utilizando ya sea rianodina fluorescente (Gómez-Viquez et al. 2010) o anticuerpos contra el RyR (Nicholas P Kinnear et al. 2008; Gilbert et al. 2014; X. Yang et al. 2005), este canal está presente en estas tres regiones. Además, diversos estudios han demostrado que en estas diferentes regiones se encuentran diferentes isoformas del RyR. RyR3 se expresa principalmente en la región perinuclear, mientras que RyR2 es abundante en el área citoplasmática y RyR1 se enriquece en la región superficial de las células del músculo liso (Clark et al. 2010). Por otra parte, se ha reportado que la bomba SERCA se localiza principalmente en las regiones perinuclear y superficial mientras que la región citoplasmática tiene un nivel reducido de la expresión de dicha bomba (Gómez-Viquez et al. 2010; Clark et al. 2010). Por ello, la importancia de estudiar en estas tres diferentes regiones, la sensibilidad tanto a rianodina como a la tapsigargina.

Algo importante a recalcar es que, en todos los registros de Ca^{2+} simultáneos realizados, se observó que el Mag-Fluo-4 reporta principalmente depósitos intracelulares de Ca^{2+} que responden a cafeína y que requieren la presencia de Ca^{2+} externo para su recuperación. Además, las respuestas a cafeína reportadas por el Fura- Red en los controles tanto del primero, segundo y tercer pulso de cafeína nos muestra que pareciese haber una difusión del ion Ca^{2+} que va desde la región perinuclear, hacia

el citoplasma y finalmente llega a la región superficial. Esto fue corroborado usando la configuración de mono-línea del microscopio confocal, que nos mostró que la onda tarda en llegar de la región perinuclear a la superficial, aproximadamente 2 segundos. Este mismo comportamiento se ha demostrado en otros tipos de células, donde se ha observado que el Ca^{2+} liberado del área perinuclear viaja en forma de una onda de Ca^{2+} que se propaga a la periferia de la célula (Rooney et al. 1990; Olson et al. 2012; Cohen et al. 2009)

En diferentes tipos de células, se ha propuesto que la propagación de la onda de Ca^{2+} que viaja a través del citoplasma celular requiere la participación de un evento de liberación de calcio inducido por calcio (CICR) para que la onda se mantenga de la misma amplitud a todo lo largo de su travesía (Meyer & Stryer 1991; McCarron et al. 2010). Sin embargo, nuestros datos sugieren que los RyRs presentes en las regiones subcelulares, superficial y citoplasmática, no responden inicialmente a la cafeína, mientras que sí lo hacen los receptores de la región perinuclear; aparentemente, lo hacen después de que la onda de Ca^{2+} se inicia en la región perinuclear en respuesta a la cafeína, debido a que se recargan con calcio. Una alternativa que nos parece poco viable sería que la onda de calcio citoplásmica se mueve en un medio refractario a dicho ion y eso explicaría por qué sólo el depósito perinuclear responde a la cafeína. Sin embargo nuestra experiencia es contraria a la idea de que el citoplasma es refractario a la onda de Ca^{2+} puesto que hay muchos sitios de unión a Ca^{2+} que además no son saturables (Guerrero et al. 1994).

Se sabe que la cafeína aumenta la probabilidad de apertura de los RyRs, incluso en presencia de nM de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Meissner 1986); por otro lado, el retirar la cafeína conduce a la rápida desactivación de los RyRs (Rousseau et al. 1988). Nuestro protocolo experimental implicó la exposición a la cafeína, en presencia de Ca^{2+} externo, durante sólo 30 s, y luego la perfusión con solución salina libre de Ca^{2+} durante otros 30 s. Esto inhibió la recuperación tanto del RS como de las reservas ácidas de Ca^{2+} , lo que implica la necesidad de una $[\text{Ca}^{2+}]_e$ externo, en el orden de mM, para recuperar los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ basal en los depósitos intracelulares. Parece que los diferentes tipos de depósitos se rellenan con Ca^{2+} que proviene de la superficie de la célula, lo que es comprensible para la región citoplasmática, que tiene reducida la expresión de la

bomba SERCA, pero ese no es el caso para la región perinuclear (Clark et al. 2010). La necesidad de Ca^{2+} externo para rellenar estos depósitos, probablemente se deba al hecho de que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ya ha regresado a los niveles previos a la estimulación con cafeína, antes de que se cerrasen los RyRs; entonces es comprensible que, después de que se retira la cafeína y se cierran los RyRs, la actividad de la bomba SERCA sería baja debido a que el nivel de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ está muy cerca del basal y esto ralentizaría la recuperación de Ca^{2+} en los depósitos, a menos que hubiese calcio externo que estaría entrando de forma continua y sería amortiguado por los depósitos intracelulares de Ca^{2+} para evitar que el citoplasma incremente sus niveles basales.

Además, nuestros datos muestran que, tanto la tapsigargina como la rianodina inhiben completamente la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sin la inhibición completa de la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$, de todas las regiones subcelulares, sugiriendo que existe una fuente oculta de Ca^{2+} , puesto que el indicador de Ca^{2+} luminal no pareciese verla en reposo. Esta poza oculta de Ca^{2+} se propone que son las proteínas amortiguadoras de Ca^{2+} del retículo, como son la calreticulina, la calnexina y la calsequestrina que están secuestrando este ión en el lumen de RS (Dagnino-Acosta & Guerrero-Hernández 2009; Perez-Rosas et al. 2015). Se ha observado in vitro, que la calsequestrina presenta diferentes estados conformacionales según el nivel de Ca^{2+} , formando dímeros y luego polímeros de la proteína, proponiendo que ésta es una forma de atrapar Ca^{2+} que no está en equilibrio con el Ca^{2+} libre del retículo y que constituye una fuente de Ca^{2+} no detectada con colorantes que miden el calcio libre del retículo (Park et al. 2004).

Por otro lado, el hecho de que la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ a la cafeína fuera completamente inhibida por la rianodina, tanto en los ROIs perinucleares y la mayoría de los ROIs citoplasmáticos, sugirió que aparte del RS, los depósitos ácidos de Ca^{2+} también expresan RyRs genuinos, que son sensibles a la aplicación de 100 μM de rianodina. Los ROIs que mostraron sensibilidad a la bafilomicina (depósitos ácidos) nos permitieron separar estos depósitos de Ca^{2+} no sólo en la región citoplásmica, sino también en las regiones perinuclear y superficial.

Previamente se ha demostrado que la tapsigargina reduce la capacidad amortiguadora de Ca^{2+} del RS (Guerrero-Hernandez et al. 2010; Perez-Rosas et al. 2015; Dagnino-Acosta & Guerrero-Hernández 2009) y los datos que se muestran aquí básicamente corroboran esta idea, ya que la tapsigargina inhibió completamente el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en todas las regiones subcelulares y además se inhibió completamente la recuperación de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ reportado por el Mag-Fluo-4 en la región perinuclear, en algunas citoplásmicas y en algunas superficiales. Sin embargo, la resolución subcelular nos permitió sugerir que la presencia de mM $[\text{Ca}^{2+}]$ externo es necesaria para el transporte de Ca^{2+} desde la superficie de la célula a la región perinuclear, tanto para el RS como para los otros depósitos de Ca^{2+} .

La región citoplásmica fue particularmente importante en este estudio porque se pudo separar el RS (definido por su sensibilidad a tapsigargina, un inhibidor potente, específico e irreversible de la bomba SERCA) de los depósitos ácidos de Ca^{2+} (definida así por nosotros por la sensibilidad a bafilomicina, un inhibidor específico, potente e irreversible de la ATPasa de H^+ tipo V). El uso de bafilomicina A1 es un enfoque bien establecido para identificar los depósitos ácidos sin alterar el Ca^{2+} almacenado en el RS o ER (Jiang et al. 2013; Ogunbayo et al. 2011). Además, los depósitos ácidos los identificamos en estas células también porque se inhibió la recuperación de las respuestas a cafeína, de forma transitoria, por el tratamiento con NH_4Cl . La alta permeabilidad del NH_3 produce la alcalinización de los depósitos ácidos de Ca^{2+} que disminuye la fuerza protón-motriz para la acumulación de Ca^{2+} (Christensen et al. 2002), un efecto que también se puede lograr con la bafilomicina, excepto que este inhibidor de la bomba de protones, es irreversible (Bowman et al. 1988).

Podemos decir que en la región perinuclear el depósito de Ca^{2+} principal es el RS, ya que todos los ROIs, en esta región, mostraron alta sensibilidad tanto a tapsigargina como a la rianodina, pero resistencia a la bafilomicina, proponiendo que en esta región se encuentran tanto la bomba SERCA y el RyR (proteínas descritas como parte del RS), pero sin descartar la posibilidad de que haya una cantidad mínima de otros depósitos de Ca^{2+} . Dado que todos los ROI perinucleares fueron sensibles a la

tapsigargina; esperábamos que todos los demás ROIs citoplásmicos y superficiales fueran sensibles a la tapsigargina, pero resultó que éste no fue el caso.

Con respecto a la región citoplásmica, como se mencionó anteriormente sólo en esta zona se pudo diferenciar claramente entre el RS y los depósitos ácidos de Ca^{2+} porque están físicamente separados en esta región. Hubo una fracción de ROIs que fueron claramente resistentes a la tapsigargina; por otro lado, hubo algunos ROIs que fueron sensibles a la bafilomicina o a la alcalinización con NH_4Cl , por ello estos últimos les denominamos depósitos ácidos, sin conocer la naturaleza exacta de estos.

Aunque ninguno de los ROIs perinucleares fue sensible a la bafilomicina, creemos que los depósitos ácidos de Ca^{2+} también están presentes en esta región subcelular porque la bafilomicina redujo el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Es importante destacar que la combinación de estos dos inhibidores (tapsigargina y bafilomicina) produjo una inhibición completa de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ inducidas por cafeína, lo que indica que ambos depósitos intracelulares de Ca^{2+} están presentes en proporciones variables en las regiones perinuclear, citoplásmica y superficial.

Es importante recalcar que pareciese que el depósito ácido no puede amplificar la liberación de Ca^{2+} del RS porque la cantidad de Ca^{2+} dentro de este depósito está muy limitada. La participación de los depósitos ácidos de Ca^{2+} en el transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la cafeína fue evidente porque utilizamos el primer pulso de cafeína como referencia y después del tratamiento con bafilomicina, la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se redujo de forma significativa; de lo contrario, esta pequeña diferencia se habría perdido en la variabilidad de amplitud de las respuestas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Por lo tanto, parece que estos depósitos ácidos tienen más bien un efecto localizado que un impacto global en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Con respecto a la región superficial, ésta fue mucho más compleja que la región citoplásmica, ya que se observaron ROIs tanto sensibles a tapsigargina, a bafilomicina o NH_4Cl , y a rianodina; pero también hubo una fracción de ROIs (~30 %) resistentes tanto a la combinación de bafilomicina y tapsigargina, o a la aplicación de rianodina. Por consiguiente, podemos decir que existen al menos tres depósitos

diferentes de Ca^{2+} , uno que sabemos que está por toda la célula, que sería el RS, otro que serían los depósitos ácidos, que estarían en las regiones del citoplasma y la superficial y un tercero depósito que presenta un mecanismo de captura de Ca^{2+} de naturaleza desconocida, ya que no depende ni de la bomba SERCA, ni de la bomba de protones, y que estaría principalmente en la región superficial. Nosotros proponemos como candidatos para rellenar con Ca^{2+} a este tercer depósito, a la bomba PMCA o al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aunque cabe señalar que son sólo especulaciones ya que carecemos de inhibidores específicos para estos transportadores y por lo mismo es difícil de comprobar esta hipótesis.

Algo interesante observado en este tercer depósito, es que contiene un canal que pareciera que es el RyR puesto que responde a cafeína, aunque no aporta Ca^{2+} al citoplasma, sin embargo, encontramos que presenta resistencia a la rianodina, por ello pensamos que no se puede considerar que sea el RyR. Esto debido a que se ha reportado que la cafeína, además de activar al RyR, también puede activar un canal que, se ha visto en la membrana plasmática de la célula, que es permeable al Ca^{2+} pero que es resistente a la rianodina; este tipo de canal está presente no sólo en las células del músculo liso (Guerrero et al. 1994) sino en otro tipo de células, como en neuronas y células endoteliales (Hoesch et al. 2001; Corda et al. 1995; Zhang et al. 2007). De hecho, la cafeína reduce la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ en el trans-Golgi (Aulestia et al. 2015; Lissandron et al. 2010) y en los gránulos secretores (Mitchell et al. 2001), pero no se sabe si estos son RyRs tal cuales o no. En las células endoteliales, la acetilcolina libera Ca^{2+} a través de un mecanismo que es sensible tanto a la rianodina como a la bafilomicina (Brailoiu et al. 2010). En muchos casos, se ha argumentado que una pequeña liberación de Ca^{2+} de los depósitos ácidos se ve fuertemente amplificada por la liberación de Ca^{2+} a través del RyR del retículo (Morgan et al. 2013a; Calcraft et al. 2009; Guse & Wolf 2016). Por ejemplo, los receptores de integrina desencadenan una liberación lenta de Ca^{2+} desde los depósitos internos por un mecanismo que es sensible tanto a la rianodina como a la bafilomicina (Umesh, M. a Thompson, et al. 2006).

En el presente trabajo descubrimos que, utilizando células de músculo liso recién aisladas de la vejiga urinaria de cobayo, la cafeína libera Ca^{2+} mediante la activación de RyRs que están presentes tanto en el RS como en los depósitos ácidos

de Ca^{2+} sensibles a la bafilomicina, pero también este alcaloide libera Ca^{2+} mediante la activación de lo que pensamos que es un canal de Ca^{2+} , que hasta ahora no había sido estudiado y que sería interesante saber si se tratase de una nueva isoforma del RyR que no responde a la rianodina, o que fuese un canal diferente al RyR pero con la característica que responde a cafeína.

Una limitación en el uso de ensayos funcionales (uso del Mag-Fluo-4) es que no podemos identificar la naturaleza de los depósitos ácidos de Ca^{2+} ni mucho menos del tercer depósito localizado principalmente en la región superficial y citoplásmica. Se ha demostrado que la cafeína produce una reducción de la $[\text{Ca}^{2+}]_L$ en la región trans del Golgi en las células cardíacas (Pizzo et al. 2011), neuronas (Cifuentes et al. 2001) y en células HeLa (Aulestia et al. 2015); sin embargo, este orgánulo no puede explicar nuestros datos porque en células de músculo liso tiene una distribución perinuclear (Thyberg et al. 1990). También se ha propuesto que los RyRs están presentes en las vesículas secretoras, como los melanosomas (Salceda & Sánchez-Chávez 2000) o en los sacos alveolares de *Paramecium* que son depósitos corticales de Ca^{2+} implicados en la exocitosis (Ladenburger et al. 2009); pero las vesículas secretoras no están bien caracterizadas en el músculo liso. Parece que los lisosomas no pueden explicar nuestros datos porque se ha demostrado que su carga con Ca^{2+} depende del ER y, por esa razón, la carga de Ca^{2+} al lisosoma es sensible a los inhibidores de la bomba SERCA (Garrity et al. 2016; Ronco et al. 2015). Se ha encontrado que los endosomas de las células- β expresan RyRs, pero sólo una pequeña fracción del RyR está presente en estos organelos (Johnson et al. 2004).

Es factible entonces que los depósitos ácidos de Ca^{2+} que responden a cafeína sean una colección de diferentes tipos de organelos y por esta razón el Mag-Fluo-4 que no es selectivo es de gran ayuda. Con el fin de identificar los organelos, a los cuales el Mag-Fluo-4 ingresa, se realizó la colocalización del Mag-Fluo-4 con indicadores de retículo, lisosomas y mitocondria, arrojándonos que solo el 60% colocaliza con retículo en la región perinuclear, alrededor del 40% en la región superficial y menos del 40% en el citoplasma, esto es comparable con los hallazgos encontrados con el uso de tapsigargina y rianodina, que nos mostró que el RS principalmente está en la región perinuclear y una porción en las otras regiones.

En relación a los lisosomas estos mostraron mucho menor grado de colocalización sobre todo en la región superficial y citoplásmica, aunque la mayor colocalización del Mag-Fluo-4 con Lyso-tracker es en la región perinuclear, sin embargo, parece que los diferentes organelos están fuertemente “empaquetados” en la región perinuclear por lo que la colocalización es relativamente alta entre todas estas estructuras, incluyendo el ER, los lisosomas y las mitocondrias. Además, no podemos decir que los depósitos de Ca^{2+} que responden a cafeína son los lisosomas ya que el tamaño y la ubicación, no coinciden con las estructuras que vemos teñidas por el Mag-Fluo-4.

Por lo que respecta a las mitocondrias, se observó muy poca colocalización del Mag-Fluo-4 con el TMRE, sugiriendo que este organelo en las células de músculo liso no es un depósito de Ca^{2+} liberable por cafeína, y que tampoco el Mag-Fluo-4 se encuentra en estos organelos como lo reportaron en un trabajo reciente (Diercks et al. 2016), pero esto depende mucho de la concentración usada del indicador de Ca^{2+} , ya que en la referencia mencionada usan 5 veces más de lo que nosotros usamos en el presente trabajo.

En conclusión, este trabajo muestra que los RyRs están presentes tanto en el RS y en los depósitos ácidos de Ca^{2+} ; además de un posible canal parecido al RyR puesto que responde a cafeína, que se encuentra en un depósito localizado en la periferia de la célula y que contiene un mecanismo de captura de Ca^{2+} aún no caracterizado, pero que es resistente a tapsigargina y a bafilomicina, estos últimos depósitos tienen sólo un efecto localizado en la respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por cafeína.

10. CONCLUSIONES

Se caracterizó la función de convolución del microscopio confocal lo que nos permitió obtener imágenes con alto contraste dentro del límite de resolución del equipo.

Se logró estandarizar la técnica de microscopía confocal, para observar los cambios de Ca^{2+} de forma simultánea con resolución sub-celular tanto del citoplasma como el luminal.

La región perinuclear presenta un depósito intracelular de Ca^{2+} compatible con el retículo sarcoplásmico, puesto que contiene RyRs y bomba SERCA. Además, que es el depósito que inicia la respuesta citoplásmica de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; que es inducida por la cafeína.

En la región citoplásmica se observaron dos depósitos intracelulares de Ca^{2+} que contienen RyRs pero con diferente mecanismo de cargado, uno sensible a tapsigargina y el otro a bafilomicina. Además, en esta región se pueden diferenciar uno del otro al estar separados.

En la región superficial se observaron varios depósitos, como sería el RS similar al de la región perinuclear y otros de característica ácida por su sensibilidad a bafilomicina. Hay un tercer depósito con un canal activado por cafeína, pero con resistencia a la rianodina y cuyo mecanismo de relleno de Ca^{2+} es resistente a bafilomicina y tapsigargina.

Nuestros datos sugieren que sólo el retículo sarcoplásmico tiene alta capacidad de Ca^{2+} , mientras que el compartimento ácido o sensible a bafilomicina es de baja capacidad. Además, pareciera que el Ca^{2+} intracelular es una respuesta global que inicia en la región perinuclear, mientras que el Ca^{2+} luminal es una respuesta local.

El Mag-Fluo-4 presentó un 60% de colocación en la región perinuclear con el indicador de retículo (ER-Tracker) pero también en un porcentaje menor (40%) con lisosomas (lysotracker) y con las mitocondrias (30%) (TMRE), cabe mencionar que fue en esta región donde se presentó el mayor valor de colocación entre todos los organelos evaluados, pero se sugiere que es debido al empaquetamiento de todos los organelos ahí presentes.

En la región citoplásmica el Mag-Fluo-4 colocaliza parcialmente con el indicador de RE (ER-tracker), y escasamente con los lisosomas y con las mitocondrias. Esto nos sugiere que efectivamente en el citoplasma está presente el RS como el principal depósito de Ca^{2+} pero que ni los lisosomas y mucho menos las mitocondrias, son los depósitos “ácidos” de Ca^{2+} reportados por el Mag-Fluo-4 en esta región. Esta distribución, muy parecida, se observó en la región superficial donde el Mag-Fluo-4 mostró una colocalización parcial con el ER-Tracker, una pequeña fracción con los lisosomas y casi nula con las mitocondrias.

El Mag-Fluo-4 no parece reportar ni mitocondrias, ni depósitos de magnesio en las condiciones de cargado usadas en el presente trabajo.

Nuestros datos con Mag-Fluo-4 sugieren la presencia de tres depósitos sensibles a cafeína, dos conteniendo al RyR y el restante al canal de cafeína. Cada uno de los depósitos cuenta con mecanismos diferentes de relleno de Ca^{2+} como se muestra en el siguiente modelo.

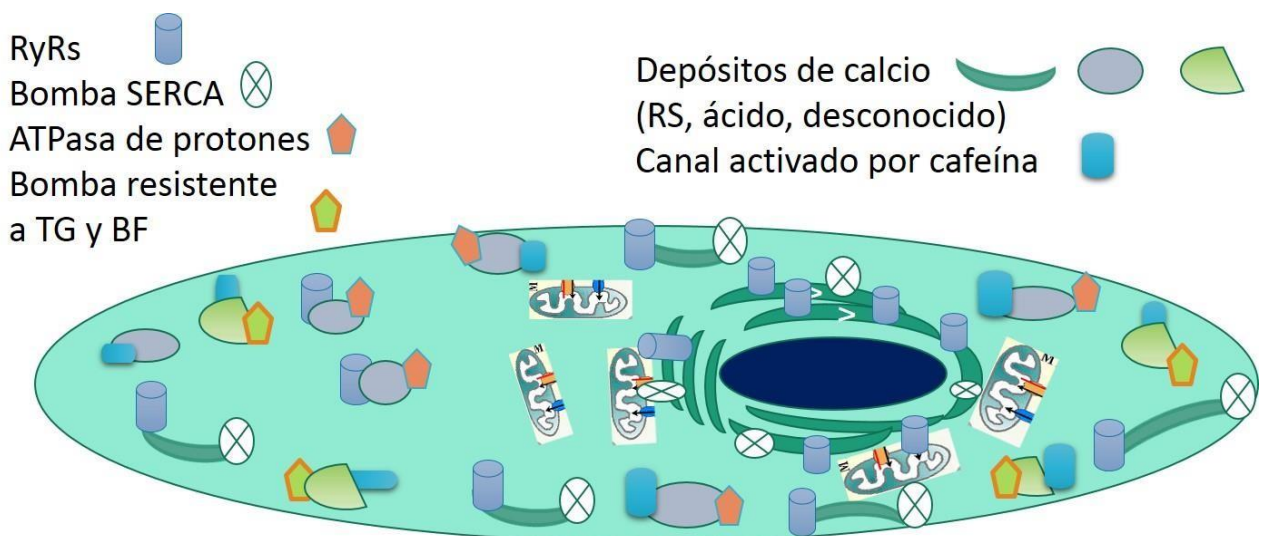


Figura 10 Modelo representativo de una célula de músculo liso con los diferentes depósitos intracelulares de Ca^{2+} distribuidos en las tres regiones subcelulares.

11. PERSPECTIVAS

El presente trabajo requiere de continuar estudiando las siguientes propuestas experimentales:

- √ Identificar los tipos de RyRs en las diferentes regiones de estudio, utilizando anticuerpos para cada una de las isoformas.
- √ Determinar la razón por la cual el RyR de la región perinuclear es capaz de producir una respuesta global de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la cafeína y no así el resto de los RyRs. Determinar si la presencia de proteínas lumenales amortiguadoras de calcio, sería la razón que explicase esta diferencia.
- √ Estudiar la naturaleza del RyR presente en los depósitos ácidos y encontrar una explicación a su limitada aportación a la respuesta de calcio intracelular inducida por cafeína.
- √ Identificar la naturaleza molecular del canal, activado por cafeína y resistente a rianodina, y determinar si está presente en otros tipos de células con la finalidad de contar con una fuente para clonarlo.
- √ Caracterizar el mecanismo de cargado con calcio del tercer depósito de calcio. Definir si fuese la PMCA o el intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

12. BIBLIOGRAFIA

1. Aulestia, F.J., Alonso, M.T. & García-Sancho, J., 2015. Differential calcium handling by the cis and trans regions of the Golgi apparatus. *The Biochemical journal*, 466(3), pp.455–65.
2. Benjamin, N. et al., 2016. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle. *Science*, 351(6270), pp.271–275.
3. Berridge, M.J., 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361(6410), pp.315–325.
4. Berridge, M.J., 2016. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 96(4), pp.1261–1296.
5. Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L., 2003. Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), pp.517–529.
6. Blaustein, M.P. & Golovina, V.A., 2001. Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores. *Trends in Neurosciences*, 24(10), pp.602–608.
7. Bolte, S. & Cordelieres, F.P., 2006. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(3), pp.13–232.
8. Borisova, L. et al., 2007. Evidence that a Ca²⁺ sparks/STOCs coupling mechanism is responsible for the inhibitory effect of caffeine on electro-mechanical coupling in guinea pig ureteric smooth muscle. *Cell Calcium*, 42(3), pp.303–311.
9. Bowman, E.J., Siebers, a & Altendorf, K., 1988. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), pp.7972–6.
10. Brailoiu, G.C. et al., 2010. Acidic NAADP-sensitive calcium stores in the endothelium: agonist-specific recruitment and role in regulating blood pressure. *The Journal of biological chemistry*, 285(48), pp.37133–7.
11. Brazer, S.-C.W. et al., 2003. Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated Ca²⁺ influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *The Journal of biological chemistry*, 278(29), pp.27208–15.
12. Brini, M. et al., 2012. Calcium pumps: Why So many? *Comprehensive Physiology*, 2(2), pp.1045–1060.
13. Buck, E. et al., 1992. Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), pp.23560–23567.
14. Burdyga, T. & Wray, S., 2005. Action potential refractory period in ureter smooth muscle is set by Ca sparks and BK channels. *Nature*, 436(7050), pp.559–62.
15. Calcraft, P.J. et al., 2009. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*, 459(7246), pp.596–600.
16. Canato, M. et al., 2010. Massive alterations of sarcoplasmic reticulum free calcium in skeletal muscle fibers lacking calsequestrin revealed by a genetically encoded probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51), pp.22326–22331.
17. Ching, L.L., Williams, A.J. & Sitsapesan, R., 2000. Evidence for Ca²⁺ activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circulation research*, 87(3), pp.201–206.
18. Choi, Y.M. et al., 2006. Regional interaction of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signals between soma and dendrites through rapid luminal Ca²⁺ diffusion. *The Journal of Neuroscience*, 26(47), pp.12127–36.
19. Christensen, K.A., Myers, J.T. & Swanson, J.A., 2002. pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *Journal of Cell Science*, 115(3), pp.599–607.
20. Churchill, G.C. & Louis, C.F., 1999. Imaging of intracellular calcium stores in single permeabilized lens cells. *The American journal of physiology*, 276(2 Pt 1), p.C426–34.
21. Cifuentes, F. et al., 2001. A ryanodine fluorescent derivative reveals the presence of high-affinity ryanodine binding sites in the Golgi complex of rat sympathetic neurons, with possible functional roles in intracellular Ca²⁺ signaling. *Cellular Signalling*, 13(5), pp.353–362.

22. Clark, J.H. et al., 2010. Identification of functionally segregated sarcoplasmic reticulum calcium stores in pulmonary arterial smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 285(18), pp.13542–13549.
23. Cohen, R. et al., 2009. Ca²⁺ Waves Initiate Antigen-Stimulated Ca²⁺ Responses in Mast Cells. *The Journal of Immunology*, 183(10), pp.6478–6488.
24. Cole, R.W., Jinadasa, T. & Brown, C.M., 2011. Measuring and interpreting point spread functions to determine confocal microscope resolution and ensure quality control. *Nature protocols*, 6(12), pp.1929–41.
25. Collier, M.L. et al., 2000. Calcium-induced Calcium Release in Smooth Muscle 7 Loose Coupling between the Action Potential and Calcium Release. *J. Gen. Physiol*, 115(May), pp.653–662.
26. Corda, S. et al., 1995. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ depletion unmasks a caffeine-induced Ca²⁺ influx in human aortic endothelial cells. *Circulation research*, 77(5), pp.927–35.
27. Dagnino-Acosta, A. & Guerrero-Hernández, A., 2009. Variable luminal sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ buffer capacity in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 46(3), pp.188–196.
28. Dally, S. et al., 2009. Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart. *Cell Calcium*, 45(2), pp.144–154.
29. Delmotte, P., Jia, L. & Sieck, G., 2014. The role of Mitochondria in Calcium Regulation in Airway Smooth Muscle. In Y.-X. Wang, ed. *Calcium Signaling in Airway Smooth Muscle Cells*. Springer Netherlands, pp. 211–234.
30. Dhindwal, S. et al., 2017. A cryo-EM – based model of phosphorylation- and FKBP12 . 6-mediated allosterism of the cardiac ryanodine receptor. *Science Signaling*, 10, pp.1–14.
31. Diercks, B.-P., Fliegert, R. & Guse, A.H., 2016. Mag-Fluo4 in T cells: Imaging of intra-organelle free Ca²⁺ concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*.
32. Dunn, K., Kamocka, M. & McDonald, J., 2011. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300, pp.723–742.
33. Efremov, R.G. et al., 2015. Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*, 517, pp.39–43.
34. Fedirko, N. et al., 2009. Regulation of early response genes in pancreatic acinar cells : external calcium and nuclear calcium signalling aspects. , pp.51–60.
35. Fessenden, J.D. et al., 2001. Ryanodine receptor point mutant E4032A reveals an allosteric interaction with ryanodine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98(5), pp.2865–2870.
36. Fitzpatrick, S. & Waisman, D.M., 1996. The uptake of calcium by isolated chromaffin granules of the adrenal medulla. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 155(155), pp.121–130.
37. Flourakis, M. et al., 2006. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), pp.1215–1217.
38. Galione, A. & Chuang, K.-T., 2012. Pyridine nucleotide metabolites and calcium release from intracellular stores. *Advances in experimental medicine and biology*, 740, pp.305–23.
39. Galione, A., Parrington, J. & Funnell, T., 2011. Physiological roles of NAADP-mediated Ca²⁺ signaling. *Science China. Life sciences*, 54(8), pp.725–732.
40. Galione, A., Patel, S. & Churchill, G.C., 2000. NAADP-induced calcium release in sea urchin eggs. *Biology of the Cell*, 92(3–4), pp.197–204.
41. Galione, A. & Petersen, O.H., 2005. The NAADP receptor: new receptors or new regulation? *Molecular interventions*, 5(2), pp.73–79.
42. Ganitkevich, V. Ya. & Isenberg, G., 1992. Caffeine-induced release and reuptake of Ca²⁺ by Ca²⁺ stores in myocytes from guinea pig urinary bladder, *Journal of physiology*, pp.99–117.
43. Garrity, A.G. et al., 2016. The endoplasmic reticulum, not the pH gradient, drives calcium refilling of lysosomes. *eLife*, 5, pp.1–18.
44. Gekle, M. et al., 1995. Endosomal alkalization reduces J_{max} and K_m of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells. *The American journal of physiology*, 268(5), pp.F899–F906.
45. George, C.H., Yin, C.C. & Lai, F.A., 2005. Toward a molecular understanding of the structure-function of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: perspectives from recombinant expression systems. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 42(2), pp.197–222.

46. des Georges, A. et al., 2016. Structural Basis for Gating and Activation of RyR1. *Cell*, 167(1), p.145–157.e17.
47. Gerasimenko, J. V., Petersen, O.H. & Gerasimenko, O. V., 2014. Monitoring of intra-ER free Ca²⁺. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 3(3), pp.63–71.
48. Gerasimenko, O. & Tepikin, A., 2005. How to measure Ca²⁺ in cellular organelles? *Cell calcium*, 38(June), pp.201–211.
49. Gerasimenko, O. V et al., 1996. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell*, 84(3), pp.473–480.
50. Gilbert, G. et al., 2014. Stretch-induced Ca²⁺ signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca²⁺ store segregation. *Cardiovascular Research*, 103(2), pp.313–323.
51. Golovina, V.A. & Blaustein, M.P., 1997. Spatially and functionally distinct Ca²⁺ stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science*, 275(5306), pp.1643–8.
52. Gómez-Viquez, L. et al., 2005. Complex effects of ryanodine on the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ levels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 38(2), pp.121–130.
53. Gómez-Viquez, N.L. et al., 2010. Inhibition of SERCA pumps induces desynchronized RyR activation in overloaded internal Ca²⁺ stores in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298, pp.1038–1046.
54. Guerrero-Hernandez, A., Dagnino-Acosta, A. & Verkhratsky, A., 2010. An intelligent sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: Release and leak channels have differential access to a concealed Ca²⁺ pool. *Cell Calcium*, 48(2–3), pp.143–149.
55. Guerrero, A., Fay, F.S. & Singer, J.J., 1994. Caffeine activates a Ca(2+)-permeable, nonselective cation channel in smooth muscle cells. *The Journal of general physiology*, 104(2), pp.375–94.
56. Guibert, C., Ducret, T. & Savineau, J.P., 2008. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 98(1), pp.10–23.
57. Guse, A.H. & Wolf, I.M.A., 2016. Ca²⁺ microdomains, NAADP and type 1 ryanodine receptor in cell activation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp.1379–1384.
58. Györke, I. et al., 2004. The Role of Calsequestrin, Triadin, and Junctin in Conferring Cardiac Ryanodine Receptor Responsiveness to Luminal Calcium. *Biophysical Journal*, 86(4), pp.2121–2128.
59. Györke, I. & Györke, S., 1998. Regulation of the Cardiac Ryanodine Receptor Channel by Luminal Ca²⁺ Involves Luminal Ca²⁺ Sensing Sites. *Biophysical Journal*, 75(6), pp.2801–2810.
60. Herrera, G.M., Heppner, T.J. & Nelson, M.T., 2000. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279(1), pp.R60-8.
61. Hoesch, R.E., Weinreich, D. & Kao, J.P., 2001. A novel Ca(2+) influx pathway in mammalian primary sensory neurons is activated by caffeine. *Journal of neurophysiology*, 86(1), pp.190–6.
62. Isshiki, M. et al., 2002. A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(45), pp.43389–98.
63. Isshiki, M. et al., 2013. FRET-based sensor analysis reveals caveolae are spatially distinct Ca²⁺ stores in endothelial cells. *Cell calcium*, 54(6), pp.395–403.
64. Isshiki, M. & Anderson, R.G., 1999. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell calcium*, 26(5), pp.201–8.
65. Isshiki, M., Mutoh, A. & Fujita, T., 2004. Subcortical Ca²⁺ waves sneaking under the plasma membrane in endothelial cells. *Circulation research*, 95(3), pp.e11-21.
66. Jiang, Y. et al., 2013. Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate (NAADP) Activates Global and Heterogeneous Local Ca²⁺ Signals from NAADP- and Ryanodine Receptor-gated Ca²⁺ Stores in Pulmonary Arterial Myocytes *. , 288(15), pp.10381–10394.
67. Johnson, J.D. et al., 2004. Ryanodine receptors in human pancreatic beta cells: localization and effects on insulin secretion. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), pp.878–880.
68. Kinnear, N.P. et al., 2008. Lysosomes co-localize with ryanodine receptor subtype 3 to form a trigger zone for calcium signalling by NAADP in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Cell Calcium*, 44(2), pp.190–201.

69. Kong, H. et al., 2008. Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor. *The Biochemical journal*, 414(3), pp.441–52.
70. Ladenburger, E.-M. et al., 2009. Novel types of Ca²⁺ release channels participate in the secretory cycle of Paramecium cells. *Molecular and cellular biology*, 29(13), pp.3605–3622.
71. Lanner, J.T. et al., 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(11), pp.1–21.
72. Laude, A.J. et al., 2005. Rapid functional assays of recombinant IP₃ receptors. *Cell Calcium*, 38(1), pp.45–51.
73. Laursen, M. et al., 2009. Cyclopiazonic Acid Is Complexed to a Divalent Metal Ion When Bound to the Sarcoplasmic Reticulum Calcium-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), pp.13513–13518.
74. Laver, D.R., 2007. Ca²⁺ Stores Regulate Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels via Luminal and Cytosolic Ca²⁺ Sites. *Biophysical Journal*, 92(10), pp.3541–3555.
75. Lee, H.C., 2011. Cyclic ADP-ribose and NAADP: Fraternal twin messengers for calcium signaling. *Science China Life Sciences*, 54(8), pp.699–711.
76. Lesh, R.E. et al., 1998. Localization of ryanodine receptors in smooth muscle. *Circulation research*, 82, pp.175–185.
77. Lissandron, V. et al., 2010. Unique characteristics of Ca²⁺ homeostasis of the trans-Golgi compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp.9198–203.
78. López-Sanjurjo, C.I. et al., 2013. Lysosomes shape Ins(1,4,5)P₃-evoked Ca²⁺ signals by selectively sequestering Ca²⁺ released from the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science*, 126(Pt 1), pp.289–300.
79. López, J.J. et al., 2005. Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by Ca²⁺- and vacuolar H⁺-ATPases in human platelets. *The Biochemical journal*, 390, pp.243–252.
80. López, J.J. et al., 2006. Two distinct Ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, ADP and vasopressin in human platelets. *Cellular Signalling*, 18(3), pp.373–381.
81. Lytton, J. et al., 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, 267(20), pp.14483–14489.
82. MacLennan, D.H., Asahi, M. & Tupling, R., 2003. The regulation of SERCA-type Pumps by Phospholamban and Sarcolipin. *Ann.NY Acad.Sci.*, 986, pp.472–480.
83. Martin, V. et al., 2002. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms: Expression, regulation, and function of the members of the SERCA3 family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), pp.24442–24452.
84. Matthews, C. & Cordelières, F.F.P., 2010. MetroloJ: an ImageJ plugin to help monitor microscopes' health. *ImageJ User & Developer Conference*, pp.2–7.
85. McCarron, J.G. et al., 2010. Agonist-evoked Ca²⁺ wave progression requires Ca²⁺ and IP₃. *Journal of Cellular Physiology*, 224(2), pp.334–344.
86. McCue, H. V et al., 2013. Generation and characterization of a lysosomally targeted, genetically encoded Ca(2+)-sensor. *The Biochemical journal*, 449(2), pp.449–57.
87. Meissner, G. et al., 1997. Regulation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺ and monovalent cations and anions. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3), pp.1628–1638.
88. Meissner, G., 1986. Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 261(14), pp.6300–6306.
89. Mészáros, L., Bak, J. & Chu, A., 1993. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Nature*, 364, pp.76–79.
90. Meyer, T. & Stryer, L., 1991. Calcium spiking. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 20(1), pp.153–174.
91. Michelangeli, F. & East, J.M., 2011. A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochemical Society Transactions*, 39(3), pp.789–797.
92. Mitchell, K.J. et al., 2001. Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic Ca²⁺ store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimera. *Journal of*

- Cell Biology*, 155(1), pp.41–51.
93. Montaña, L.M. & Bazan-Perkins, B., 2005. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*, 83(8–9), pp.717–723.
 94. Morgan, A.J. et al., 2013a. Bidirectional Ca²⁺ signaling occurs between the endoplasmic reticulum and acidic organelles. *The Journal of cell biology*, 200(6), pp.789–805.
 95. Morgan, A.J., Davis, L.C. & Galione, A., 2015. Imaging approaches to measuring lysosomal calcium. In *Methods in Cell Biology*. Elsevier Ltd, pp. 159–195.
 96. Muñoz, A.; Garcia, L.G.-H.A., 1998. In Situ Characterization of the Ca²⁺ Sensitivity of Large Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channels: Implications for Their Use as Near-Membrane Ca²⁺ Indicators in Smooth Muscle Cells. *Biophysical journal*, 75, pp.1774–1782.
 97. Myoung, K.P., Kwang, K.L. & Uhm, D.Y., 2002. Slow depletion of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores and block of store-operated Ca²⁺ channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate in mouse pancreatic acinar cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 365(5), pp.399–405.
 98. Nixon, G.F., Mignery, G.A. & Somlyo, A. V., 1994. Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 15(6), pp.682–700.
 99. Ogunbayo, O.A. et al., 2011. Cyclic adenosine diphosphate ribose activates ryanodine receptors, whereas NAADP activates two-pore domain channels. *Journal of Biological Chemistry*, 286(11), pp.9136–9140.
 100. Olson, M.L. et al., 2012. Microdomains of muscarinic acetylcholine and Ins(1,4,5)P₃ receptors create "Ins(1,4,5)P₃ junctions" and sites of Ca²⁺ wave initiation in smooth muscle. *Journal of cell science*, 125(Pt 22), pp.5315–28.
 101. Park, H. et al., 2004. Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *The Journal of biological chemistry*, 279(17), pp.18026–33.
 102. Patel, S. & Cai, X., 2015. Cell Calcium Evolution of acidic Ca²⁺ stores and their resident Ca²⁺-permeable channels. *Cell Calcium*, 57(3), pp.222–230.
 103. Patel, S. & Muallem, S., 2011. Acidic Ca²⁺ stores come to the fore. *Cell Calcium*, 50(2), pp.109–112.
 104. Peng, W. et al., 2016. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science*, 354(6310).
 105. Perez-Rosas, N.C. et al., 2015. Kinetics on demand is a simple mathematical solution that fits recorded caffeine-induced luminal SR Ca²⁺ changes in smooth muscle cells. *PLoS ONE*, 10(9), pp.1–22.
 106. Periasamy, M. et al., 2017. Role of SERCA Pump in Muscle Thermogenesis and Metabolism. *Comprehensive Physiology*, 7(July), pp.879–890.
 107. Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A., 2007. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle & nerve*, 35(4), pp.430–42.
 108. Pessah, I.N., Stambuk, R.A. & Casida, J.E., 1987. Ca²⁺-activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg²⁺, caffeine, and adenine nucleotides. *Molecular pharmacology*, 31(3), pp.232–238.
 109. Pessah, I.N. & Zimanyi, I., 1991. Characterization of multiple [3H]ryanodine binding sites on the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Molecular pharmacology*, 39(5), pp.679–89.
 110. Piotr Wendykier, 2009. Parallel Iterative Deconvolution. *sitio web de imageJ*; <https://sites.google.com/site/piotrwendykier/software/deconvolution/paralleliteratedeconvolution>
 111. Pittman, J.K., 2011. Vacuolar Ca²⁺ uptake. *Cell Calcium*, 50(2), pp.139–146.
 112. Pizzo, P. et al., 2011. Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium*, 50(2), pp.184–192.
 113. Pizzo, P., Fasolato, C. & Pozzan, T., 1997. Dynamic properties of an inositol 1,4,5-trisphosphate- and thapsigargin-insensitive calcium pool in mammalian cell lines. *The Journal of cell biology*, 136(2), p.355–66.
 114. Pizzo, P., Lissandron, V. & Pozzan, T., 2010. The trans-golgi compartment: A new distinct intracellular Ca store. *Communicative & integrative biology*, 3(5), pp.462–4.

115. Plattner, H. & Verkhratsky, A., 2013. Ca²⁺ signalling early in evolution--all but primitive. *Journal of cell science*, 126(Pt 10), pp.2141–50.
116. Ranatunga, K.M. et al., 2007. Quantification of the effects of a ryanodine receptor channel mutation on interaction with a ryanoid. *Molecular membrane biology*, 24(3), pp.185–193.
117. Rizzuto, R. & Pozzan, T., 2006. Microdomains of Intracellular Ca²⁺ : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Review*, 86, pp.369–408.
118. Rodríguez, A. et al., 1997. Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 137(1), pp.93–104.
119. Ronco, V. et al., 2015. A novel Ca²⁺ -mediated cross-talk between endoplasmic reticulum and acidic organelles: Implications for NAADP-dependent Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium*, 57, pp.89–100.
120. Rooney, A., Sass, J. & Thomas, P., 1990. Agonist-induced Cytosolic Calcium Oscillations Originate from a Specific Locus in Single Hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 265(18), pp.10792–10796.
121. Rousseau, E. et al., 1988. Activation of the Ca²⁺ release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Archives of biochemistry and biophysics*, 267(1), pp.75–86.
122. Rousseau, E. & Meissner, G., 1989. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 256(2), pp.H328-33.
123. Rueda, A. et al., 2002. The initial inositol 1,4,5-trisphosphate response induced by histamine is strongly amplified by Ca²⁺ release from internal stores in smooth muscle. *Cell calcium*, 31(4), pp.161–173.
124. Saftig, P. & Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), pp.623–635.
125. Salceda, R. & Sánchez-Chávez, G., 2000. Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium. *Cell calcium*, 27(4), pp.223–229.
126. Santulli, G. & Marks, A.R., 2015. Essential roles of intracellular calcium release channels in muscle, brain, metabolism, and aging. *Current Molecular Pharmacology*, 8(2), pp.206–222.
127. Shah, P.K. & Sowdhamini, R., 2001. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein engineering*, 14(11), pp.867–874.
128. Shen, D. et al., 2012. Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. *Nature communications*, 3, p.731.
129. Shmigol, A. V., Eisner, D.A. & Wray, S., 2001a. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic [Ca²⁺] in rat uterine smooth muscle cells. , pp.707–713.
130. Shmigol, A. V., Eisner, D.A. & Wray, S., 2001b. Simultaneous measurements of changes in sarcoplasmic reticulum and cytosolic [Ca²⁺] in rat uterine smooth muscle cells. *Journal of Physiology*, 531(3), pp.707–713.
131. Sitsapesan, B.Y.R. & Williams, A.J., 1990. Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *Journal of Physiology*, 423, pp.425–439.
132. Somlyo, A. & Himpens, B., 1989. Cell calcium in smooth muscle. *FASEB Journal*, 3(11), pp.2266–2276.
133. Somlyo & Franzini-Armstrong, C., 1985. New views of smooth muscle structure using freezing, deep-etching and rotary shadowing. *Experientia*, 41(7), pp.841–56.
134. Souza, L.B. de & Ambudkar, I.S., 2014. Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels. *Cell Calcium*, 56(2), pp.43–50.
135. Steenbergen, J.M. & Fay, F.S., 1996. The Quantal Nature of Calcium Smooth Muscle Cells Results. *The Journal of biological chemistry*, 271(4), pp.1821–1824.
136. Sutko, J.L. et al., 1997. The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds. *Pharmacological reviews*, 49(1), pp.53–98.
137. Thomas, N.L. & Williams, A.J., 2012. Pharmacology of ryanodine receptors and Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, pp.383–397.

138. Thyberg, J. et al., 1990. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 10(6), pp.966–990.
139. Toyoshima, C. & Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature*, 418(6898), pp.605–611.
140. Tykocki, N.R., Boerman, E.M. & Jackson, W.F., 2017. Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Comprehensive Physiology*, 7(April), pp.485–581.
141. Umesh, A., Thompson, M. a, et al., 2006. Integrin ligands mobilize Ca²⁺ from ryanodine receptor-gated stores and lysosome-related acidic organelles in pulmonary arterial smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp.34312–23.
142. Vaithianathan, T. et al., 2010. Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 299, pp.C264–C278.
143. Vandecaetsbeek, I. et al., 2011. The Ca²⁺ Pumps of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, pp.1–25.
144. Verboomen, H. et al., 1994. The functional importance of the extreme C-terminal tail in the gene 2 organellar Ca(2+)-transport ATPase (SERCA2a/b). *The Biochemical journal*, 303 (Pt 3, pp.979–84.
145. Verkhratsky, A.J. & Petersen, O.H., 1998. Neuronal calcium stores. *Cell Calcium*, 24(5–6), pp.333–343.
146. Voeltz, G.K., Rolls, M.M. & Rapoport, T.A., 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 3(10), pp.944–950.
147. Williams, R.J.P., 2006. The evolution of calcium biochemistry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(11), pp.1139–1146.
148. Wootton, L.L. & Michelangeli, F., 2006. The effects of the phenylalanine 256 to valine mutation on the sensitivity of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Ca²⁺ pump isoforms 1, 2, and 3 to thapsigargin and other inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11), pp.6970–6976.
149. Wray, S. & Burdyga, T., 2010. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiological reviews*, 90(1), pp.113–178.
150. Xu, Y. et al., 2012. Epidermal growth factor-induced vacuolar (H⁺)-ATPase assembly: A role in signaling via mTORC1 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), pp.26409–26422.
151. Yan, Z. et al., 2015. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature*, 517(7532), pp.50–55.
152. Yang, X.R. et al., 2005. Multiple Ryanodine Receptor Subtypes and Heterogeneous Ryanodine Receptor-Gated Ca²⁺ stores in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells. *Am.J Physiol Lung Cell Mol.Physiol*, 289, pp.338–348.
153. Yoshimori, T. et al., 1991. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), pp.17707–17712.
154. Young, R.C. & Mathur, S.P., 1999. Focal sarcoplasmic reticulum calcium stores and diffuse inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in human myometrium. *Cell calcium*, 26(1–2), pp.69–75.
155. Zalk, R. et al., 2015. Structure of a mammalian ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), pp.44–49.
156. Zhang, Y. et al., 2007. Caffeine-activated large-conductance plasma membrane cation channels in cardiac myocytes: characteristics and significance. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 1655, pp.2448–2461.
157. Zinchuk, V. & Zinchuk, O., 2008. Quantitative colocalization analysis of confocal fluorescence microscopy images. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, Chapter 4(June), p.Unit 4.19.
158. Zucchi, R. & Ronca-Testoni, S., 1997. The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharmacological reviews*, 49(1), pp.1–51.