

11262  
1ej  
16-A



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ANALISIS EXPERIMENTAL DE LAS CONTRACTURAS  
INDUCIDAS POR  $B_{\alpha++}$  EN EL MUSCULO  
VENTRICULAR DE LA RATA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FISIOLOGIA)**

**P R E S E N T A :**

**MARIA CRISTINA PAREDES CARBAJAL**

**FALLA DE ORIGEN**

**MEXICO, D. F.**

**1987**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

INDICE.

- I) RESUMEN ----- 5
- II) INTRODUCCION ----- 7
  - 1. REACCION BASICA DE LA CONTRACCION ----- 7
  - 2. REGULACION DE LA CONTRACCION ----- 9
  - 3. PAPEL DEL ION CALCIO EN LA CONTRACCION MUSCULAR ----- 11
    - a) Breve revisión Histórica ----- 11
    - b) Regulación de la Concentración del Ión Ca en el Citoplasma ----- 18
      - I) Bombas de las Membranas Superficiales ----- 18
      - ii) Bomba de Ca<sup>++</sup> del Retículo Endoplásmico ----- 20
      - iii) Transporte Mitocondrial ----- 21
  - 4. ACOPLAMIENTO EXCITACION - CONTRACCION ----- 23
    - a) Origen del Ca<sup>++</sup> Activador en el Músculo Cardíaco --- 23
    - b) Corriente de Ca<sup>++</sup> ----- 24
    - c) Intercambio Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> ----- 26
    - d) Liberación de Ca<sup>++</sup> del Retículo Sarcoplásmico ----- 29
      - I) Transmisión Eléctrica: ----- 30
        - i- Hipótesis del Movimiento de Cargas ----- 30
        - ii- Hipótesis de la Depolarización del Retículo Sarcoplásmico ----- 30
      - ii) Transmisión Química: ----- 32
        - i- Hipótesis de la Liberación de Ca<sup>++</sup> Inducida por Ca<sup>++</sup> ----- 32
        - ii- Hipótesis de la Liberación de Ca<sup>++</sup> Inducida por el 1,4,5-Trifosfato de Inositol ----- 38

5. EFECTO DEL Ba++ ----- 39
- III) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ----- 48
- IV) OBJETIVOS ----- 51
- V) MATERIAL Y METODOS ----- 52
1. PREPARACION ----- 52
  2. SISTEMA DE PERFUSION Y DE CONTROL DE LA TEMPERATURA ----- 53
  3. SOLUCIONES ----- 54
  4. SISTEMA DE REGISTRO Y ESTIMULACION ----- 55
  5. DISEÑO EXPERIMENTAL ----- 58
- VI) RESULTADOS ----- 64
1. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CONTRACTURA INDUCIDA POR Ba++ ----- 64
    - a) Reproducibilidad de los Efectos del Ba++ ----- 67
    - b) Reversibilidad de lo Efectos del Ba++ ----- 68
    - c) Efectos del Ba++ Sobre el Potencial de Membrana ----- 68
  2. FASE I: CARACTERIZACION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES BAJO LAS CUALES SE PRODUCEN LAS CONTRACTURAS POR Ba++ --- 69
    - a) Efecto de la Concentración de Ba++ ----- 69
    - b) Efecto de la Temperatura ----- 72
    - c) Efecto de la Concentración de Ca++ ----- 74
  3. Fase II: ANALISIS DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE LAS CONTRACTURAS POR Ba++ ----- 76
    - a) Efecto del Ca++ ----- 76
    - b) Efecto de la Modificación del pH ----- 79
    - c) Efecto de la Cafeína ----- 84

4. Fase III: ANALISIS DE LOS MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA  
RELAJACION INDUCIDA AL RETIRAR EL Ba++ DEL MEDIO ----- 88

a) Efecto de la Temperatura ----- 88

b) Efecto de la Cafeina ----- 92

VII) DISCUSION ----- 98

VIII) REFERENCIAS ----- 115

## RESUMEN.

El Ba++ puede substituir al Ca++ como activador de la contracción muscular. Bajo ciertas condiciones experimentales produce contracturas estables y sostenidas en el músculo cardíaco. Estas contracturas se han usado ampliamente en investigaciones sobre las propiedades mecánicas del músculo cardíaco. Sin embargo, el mecanismo responsable del desarrollo de tensión y los procesos involucrados en la fase de relajación de estas contracturas, no han sido dilucidados.

En el presente trabajo, se probó la hipótesis de que la contractura es causada por un incremento de la concentración intracelular de Ba++ causado por un influjo de Ba++ a través de los canales del Ca++ abiertos por la depolarización y, se analizó la posible participación del retículo sarcoplásmico en la fase de relajación. Para tal fin se realizó, en músculos papilares de la rata, una serie de experimentos, cuyo propósito fué: a).- Encontrar las condiciones óptimas bajo las cuales se producen las contracturas. b).- Determinar si la contractura es causada por el influjo transarcolemal de Ba++ ó por la liberación de Ca++ de depósitos intracelulares y c).- Analizar los efectos de la temperatura y de la cafeína sobre la fase de relajación.

Estos experimentos mostraron: 1).- Que el bloqueo de los canales de Ca++ con Co++ y la disminución del pH previenen el desarrollo de la contractura, si dichas maniobras se realizan antes de la aplicación del Ba++ y producen una relajación cuando se

efectúan durante el desarrollo de la contractura. 2).- Que la contractura se sigue observando en preparaciones previamente expuestas a la cafeína (30 mM) y a períodos prolongados de perfusión con solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$ . 3).- Que la velocidad de relajación aumenta cuando se incrementa la temperatura (Q10.3) y disminuye en presencia de cafeína. 4).- Que la aplicación de cafeína durante la fase de relajación de la contractura inducida por  $Ba^{++}$  produce una contractura de amplitud varias veces mayor que la inducida por este fármaco antes de la exposición de la preparación al  $Ba^{++}$ .

Los resultados de este estudio sugieren que el desarrollo de tensión durante la contractura es atribuible a la activación directa de los elementos contráctiles por el  $Ba^{++}$  que entra a través de los canales del  $Ca^{++}$  y que el retículo sarcoplásmico es capaz de acumular el  $Ba^{++}$  aunque al parecer, no es la única estructura que participa en la fase de relajación de la contractura. Finalmente, se propone la existencia de un proceso capaz de extruir activamente al  $Ba^{++}$ , hacia el líquido extracelular.

## II).- INTRODUCCION.

### 1).- REACCION BASICA DE LA CONTRACCION:

La reacción básica de la contracción en la fibra muscular intacta es la interacción entre dos poblaciones de moléculas proteicas que forman dos tipos de filamentos que se interdigitan entre sí. Por un lado se encuentra la miosina que forma el filamento grueso y, por el otro se encuentra la actina que forma el filamento delgado. Como fué primero propuesto por H.E. Huxley y Handson (1954) y A.F. Huxley y Niedergerke (1954) y ahora es aceptado generalmente, la contracción se basa en el deslizamiento relativo de estas dos series de filamentos, uno con respecto a otro, utilizando la energía derivada de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP). Los filamentos delgados de actina están unidos a los discos Z, mientras que los filamentos gruesos de miosina ocupan el centro de la sarcómera (H.E. Huxley, 1972, 1973).

Individualmente las moléculas de actina son relativamente esféricas con un radio de aproximadamente 2.8 nm., pero en la célula muscular forman polímeros a manera de cordones de doble hebra de cerca de 1  $\mu$ m de longitud. Las moléculas de miosina son altamente asimétricas (Lowy, et al., 1969), consisten de una porción alargada en forma de bastón a la cual se le unen dos porciones globulares llamadas cabezas. Los filamentos gruesos de miosina de aproximadamente 1.5  $\mu$ m de longitud, están formados por la interacción de las porciones en forma de bastón. Las cabezas de la miosina se proyectan sobre la superficie de estos filamentos, y son

visibles en las micrograffias electrónicas como proyecciones laterales del filamento grueso. Estas cabezas interactúan con la actina de los filamentos delgados durante la contracción formando los puentes transversos. El movimiento, hacia el centro de la sarcómera, de estos puentes transversos unidos a la actina origina un movimiento relativo de los filamentos y el acortamiento del músculo o, en condiciones isométricas, el desarrollo de tensión.

La energía para el trabajo realizado al contrarse la célula es derivada de moléculas de ATP, que se hidrolizan durante cada interacción cíclica con la actina (A.F.Huxley,1957; H.E. Huxley 1969, Taylor, et al., 1970) en un sitio con actividad de ATPasa localizado en las cabezas de miosina.

La afinidad de la miosina por la actina es tan alta que en ausencia de ATP y otras proteínas, las dos moléculas permanecerían fijas una a la otra para producir lo que se ha llamado "estado de rigor" (Daves, 1965, White, et al., 1970). El ATP causa la disociación de las dos moléculas, lo que permite el retorno de la cabeza a su posición original.

El sustrato real para la interacción cíclica y la relajación es el trifosfato de adenosina - Magnesio (Mg - ATP), más que el ATP, pero los iones de magnesio no son un factor limitante en condiciones normales.

La relajación y/o la inhibición de la interacción entre la actina y la miosina se debe a dos proteínas adicionales: la troponina y la tropomiosina, que se encuentran en los filamentos delgados. Estas evitan la interacción de la actina con la miosina en la presencia de ATP y en la ausencia de  $Ca^{++}$ .

La tropomiosina es una molécula en forma filamentosa que yace en la canaladura formada por las dos cadenas entrelazadas de monómeros de actina y abarcando una longitud de siete monómeros de actina. La troponina es un complejo globular de tres subunidades proteicas, se encuentra fija a la tropomiosina en íntima proximidad a la actina.

## 2).-REGULACION DE LA CONTRACCION.

Un sistema contráctil relajado, consistente de actina y de miosina y de las proteínas reguladoras, tropomiosina y troponina, puede ser activado por la adición de pequeñas cantidades de iones de  $Ca^{++}$  (Ohnishi, 1981; Weber et al., 1963). Esto fué demostrado primero por las inyecciones intracelulares de  $Ca^{++}$  en el músculo esquelético intacto (Inesi, et al., 1970, Kamada et al., 1943) y después en preparaciones de fibras desnudas de músculo cardíaco y de músculo esquelético (Natori, 1954a,b, Podolsky et al., 1964, Winegrad, 1971) donde la membrana había sido eliminada mecánicamente o químicamente, para permitir el control del "micromedio" del sistema contráctil desde el espacio extracelular. Con una concentración de iones de  $Ca^{++}$  menor de  $1 \times 10^{-7}$  M, no se genera activación de las proteínas contráctiles, y la activación es máxima a concentraciones de  $1 \times 10^{-5}$  M (Ebashi, et al., 1968, 1969). Existe una relación sigmoideal entre la concentración

de  $Ca^{++}$  y el grado de activación.

Los iones de  $Ca$  inician la contracción al unirse a una de las subunidades TNC de la troponina lo que suprime el efecto inhibitor de la tropomiosina sobre la interacción entre la actina y la miosina (Ebashi, et al., 1968). La troponina está constituida por tres subunidades, una que fija iones de  $Ca$  (troponina C ó TNC), una responsable de la inhibición de la contracción (troponina I ó TNI), una tercera que se fija a la tropomiosina (troponina T ó TNT) (Potter et al., 1975). La unidad TNC controla a todo el complejo. En el músculo esquelético la TNC tiene cuatro sitios de fijación para el  $Ca^{++}$ , dos de alta afinidad y dos de baja afinidad. La ocupación de los sitios de baja afinidad es la responsable de suprimir la influencia inhibitor de la troponina (Potter et al., 1975, Weber, et al., 1973).

La TNC del músculo cardíaco tiene únicamente tres sitios de fijación para el  $Ca^{++}$  (VanErd et al., 1976) de los cuales dos son de alta afinidad y uno de baja afinidad. Para la activación es necesaria la ocupación del sitio de baja afinidad (Solaro et al., 1974b).

La troponina está unida a los filamentos delgados en dos sitios: la troponina T a la tropomiosina, y la troponina I a la actina. La interacción de la troponina C con las otras dos subunidades depende de la presencia de  $Ca^{++}$ ; la unión de  $Ca^{++}$  a la troponina C promueve la interacción de la troponina C con la troponina I y disocia el complejo de la actina sin causar una

separación de la troponina T de la tropomiosina. El movimiento resultante de la tropomiosina relativo a las cadenas de la actina (Haselgrove, 1975; Hitchcock, et al., 1973; H.E. Huxley, 1972 ) suprime la inhibición de la interacción actina-miosina, sin embargo, no es claro si el movimiento de la tropomiosina suprime una interferencia de tipo físico o está correlacionado con un cambio conformacional de la actina.

### 3).- PAPEL DEL CALCIO EN LA CONTRACCION MUSCULAR.

#### a).- Breve Revisión Histórica:

Ringer en 1883, observó que el corazón de la rana dejaba de latir en un medio en el cual faltaba el calcio. Posteriormente se demostró que aunque cesara la contracción en la ausencia de  $Ca^{++}$  en la solución, no se perdía la excitabilidad de la preparación (Mines, 1913 ). Así fué cómo desde el inicio del estudio de la fisiología del corazón se demostró que la presencia de los iones de Ca en el medio extracelular era indispensable para el mantenimiento de la contractilidad.

Aunque investigaciones posteriores en el músculo esquelético condujeron a conclusiones similares sobre el papel del  $Ca^{++}$  en el proceso de la activación, en este tipo de músculo el  $Ca^{++}$  extracelular no tenía un papel fundamental.

Kamada y Kinoshita (1943) y Heilbrunn y Wiercinski (1947), observaron que la inyección de  $Ca^{++}$  dentro del mioplasma de fibras musculares esqueléticas podía producir una contracción local, y que de los iones normalmente existentes en los líquidos corporales el

Ca<sup>++</sup> era el único capaz de inducir el proceso contráctil. El papel del Ca<sup>++</sup> en la contracción muscular no fué aclarado hasta que un número de investigadores probaron que una cantidad diminuta de Ca<sup>++</sup> ejercía un papel crítico sobre la contractilidad de fibras musculares glicerizadas (Watanabe, 1955; Watanabe et al., 1957), sobre la actividad de ATPasa de miofibrillas aisladas (Weber et al., 1963), sobre la actomiosina natural (Watanabe, et al., 1953; Weber, 1959, Weber et al., 1961) sobre la contracción de miofibrillas (Weber et al., 1961; Weber et al., 1963), y sobre la superprecipitación de la actomiosina (Ebashi et al., 1962, Weber et al., 1961).

Hill (1949) calculó que una sustancia que difundía desde la superficie de una fibra muscular esquelética (diámetro de 50 - 150 um) no podía alcanzar la suficiente concentración en toda la sección transversal de la fibra para activar la contracción durante el curso temporal del estado activo (el estado activo, medido a 0 oC, en el músculo sartorio de rana, dura 40 msec.). Esta conclusión junto con la observación de que el músculo esquelético se contrae por muchas horas en una solución libre de Ca<sup>++</sup> (Frank, 1960, Lüttgau, 1963; Edman, et al., 1964) permitió descartar al Ca<sup>++</sup> extracelular como origen principal del Ca<sup>++</sup> que activa la contracción. Si el Ca<sup>++</sup> activaba la contracción y no venía del espacio extracelular, entonces debía existir algún depósito intracelular de Ca<sup>++</sup>, del cual esta ión era liberado durante la excitación.

Marsh (1951, 1952) encontró que en un extracto acuoso de músculo esquelético había un factor capaz de inducir la relajación de haces miofibrilares; tales observaciones fueron confirmadas subsiguientemente por Bendall (1958) y Hasselbach (1977), Hasselbach et al. (1953). Kumagai et al. (1955) y Ebashi (1958) mostraron que la actividad relajante estaba asociada con la fracción particulada de músculo descrita por Kielley y Meyerhof (1948, 1950), la cual poseía una actividad de ATPasa dependiente de  $Mg^{++}$ .

La fracción microsomal que poseía esta actividad relajante estaba constituida por vesículas de membrana (Ebashi et al., 1962; Muscatello, et al., 1962; Nagai, et al., 1960), que presumiblemente eran derivadas del retículo sarcoplásmico (Porter, 1961; Muscatello et al. 1961, 1962).

Hasselbach y Makinosa (1962), Ebashi (1961) y Ebashi y Lipmann (1962) demostraron que la fracción microsomal era capaz de remover una cantidad significativa de  $Ca^{++}$  del medio en la presencia de ATP y  $Mg^{++}$ .

Estudios realizados por Bennett et al. (1953), Franzini-Armstrong, et al. (1975) Peachey (1965), Peachey et al. (1968), Porter et al. (1957), y Porter (1961) demostraron que el retículo sarcoplásmico consistía de una estructura reticular limitada por una membrana formada de vesículas continuas, túbulos y cisternas que rodeaban a las miofibrillas. También encontraron otra estructura tubular que corría perpendicularmente al eje longitudinal del músculo (los túbulos transversos ó sistema tubular T), el cual

formaba una unión con la cisterna terminal (una parte ensanchada del retículo sarcoplásmico) para formar un saco continuo. Se encontró que las membranas del sistema tubular T eran continuas con la membrana de la superficie (sarcolema) y que su luz era una continuación del espacio extracelular (Endo, 1964; Franzini-Armstrong, 1975; H.E. Huxley, 1964).

Estas observaciones, de que las células musculares poseían tanto un sistema contráctil sensible al  $Ca^{++}$  como un sistema de membranas capaces de acumular  $Ca^{++}$ , llevaron al concepto fisiológico de que el  $Ca^{++}$  liberado por el retículo sarcoplásmico podía inducir la contracción muscular, y que la captación de  $Ca^{++}$  por el retículo sarcoplásmico podía dar origen a la relajación (Huxley et al., 1958; Fujino et al., 1961; Howell, 1969; Jübsis, et al., 1966; Hasselbach et al., 1953; Ridgway et al., 1967).

Ebashi et. al. (1968, 1969), demostraron la existencia de la troponina, una proteína sensible al  $Ca^{++}$ , en los filamentos delgados de las miofibrillas.

Parecía probable que en cada ciclo de la contracción y relajación, se llevaba a cabo la liberación y la subsiguiente reaccumulación de  $Ca^{++}$  por el retículo sarcoplásmico. Endo et. al. (1970) y Endo et al., (1973), demostraron que la depolarización del retículo sarcoplásmico en la preparación de Natori (1954a,b) causaba una liberación de  $Ca^{++}$  que iniciaba la contracción.

Los hallazgos en el músculo esquelético fueron tan demostrativos que fué difícil recordar la observación inicial de Ringer, con respecto al papel indispensable del  $Ca^{++}$  extracelular para la contracción del miocardio. Fué sólo en la década de 1960 que los resultados de una serie de investigaciones sobre la ultraestructura y la contractilidad de músculo cardíaco sugirieron el posible origen extracelular de los iones de Ca que intervienen en la activación de la contracción del músculo cardíaco. Por una parte, los estudios morfológicos al demostrar el tamaño reducido de la célula cardíaca (4-20  $\mu$ m de diámetro) hicieron evidente que, a diferencia de la evidencia presentada por Hill para el músculo esquelético, en la célula cardíaca la difusión del  $Ca^{++}$  desde el medio extracelular puede elevar la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  en un tiempo compatible con el curso temporal del establecimiento del estado activo hasta el nivel necesario para activar la contracción (Staley et al., 1968). Por otra parte los estudios sobre la contractilidad cardíaca mostraron que la tensión depende estrechamente de la concentración extracelular de  $Ca^{++}$ .

La mayoría de los modelos actuales del acople excitación - contracción, en el músculo cardíaco atribuyen un papel crítico a la concentración extracelular de  $Ca^{++}$  y al influjo transmembranal de  $Ca^{++}$ . Sin embargo, los dos modelos más aceptados proponen diferentes papeles al influjo de  $Ca^{++}$ . El modelo que propone la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$ , estudiado ampliamente por Fabiato y Fabiato (1975a, 1978, 1979, 1981, 1982, 1983), quienes proponen que el influjo de  $Ca^{++}$  es insuficiente para activar

directamente a los miofilamentos y que el influjo relativamente pequeño de  $Ca^{++}$  (vía canales del  $Ca^{++}$ ) induce la liberación subsecuente de cantidades mucho mayores de  $Ca^{++}$  desde el retículo sarcoplásmico, el cual entonces activa a los miofilamentos. El otro modelo propone que la magnitud del influjo de  $Ca^{++}$  durante un latido cardíaco es suficiente para activar directamente a los miofilamentos sin que sea necesaria la liberación adicional de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico. Langer y sus colaboradores (1973) han sido los sustentantes más fuertes de los modelos en los cuales el influjo transmembranal de  $Ca^{++}$  es el principal origen del  $Ca^{++}$  activador en el miocardio de mamífero (Bers, et al., 1979; Langer, 1973; Langer et al., 1976; Langer, 1980; Philipson, 1979).

En parte la diferencia entre estos dos modelos es cuantitativa. Hasta hace poco se suponía que el  $Ca^{++}$  que entra a la célula durante un latido cardíaco, es insuficiente para activar directamente a los miofilamentos. Estudios recientes de fijación de voltaje en células aisladas (Hume et al., 1983; Isenberg, 1982), de mediciones de influjo de  $Ca^{++}$  marcado (Lewartowski, et al., 1982), y de determinación de  $Ca^{++}$  extracelular con microelectrodos selectivos al  $Ca^{++}$  (Bers, 1983) demuestran que el influjo de  $Ca^{++}$  (10 - 183  $\mu\text{mol/Kg}$  de tejido húmedo), es de la magnitud requerida, para la activación máxima de los miofilamentos (15 - 42  $\mu\text{mol/Kg}$  de tejido húmedo) (Fabiato, 1983; Solaro et al., 1974b). La gran variabilidad en los valores reportados, tanto, para el influjo de  $Ca^{++}$  como, para los requerimientos de  $Ca^{++}$  para la activación de la sacudida, demuestra el problema real que hay en su cuantificación. Hasta el

momento, ninguno de estos valores es conocido con suficiente precisión para apoyar inequívocamente cualquiera de los dos modelos descritos.

Bers (1985) al analizar la participación relativa del influjo de  $Ca^{++}$  y del retículo sarcoplásmico en la activación del músculo cardíaco durante la recuperación postrreoso, encuentra que el primer latido de recuperación postrreoso depende principalmente de la liberación de  $Ca^{++}$  por el retículo sarcoplásmico, que el influjo de  $Ca^{++}$  durante ese latido es pequeño y que el influjo se va incrementando en los latidos subsiguientes hasta alcanzar un estado estacionario. También encuentra que durante el estado estacionario existe una diferencia entre las distintas especies animales en relación al origen del  $Ca^{++}$  para la activación de la contracción. Según este autor la participación relativa de la liberación de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico decrece, en las especies estudiadas, en el siguiente orden: Ventrículo de rata adulta > aurícula de conejo > ventrículo de conejo > ventrículo de rana.

b).-Regulación de la Concentración del  $Ca^{++}$  en el Citoplasma:

La concentración citoplásmica de  $Ca^{++}$  libre en las células vivientes en reposo es de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos; es decir,  $1 \times 10^3$  veces menor que la concentración de  $Ca^{++}$  libre en el medio externo. Este gran gradiente es establecido y mantenido por poderosas bombas localizadas en la membrana superficial de las células (Borie, 1981; Carafoli et al., 1982; Martonosi, 1983; Schatzmann, 1982; Vicenzi et al., 1980), en el retículo endoplásmico (Hasselbach, 1981; Ikemoto, 1982; Martonosi, 1982; Martonosi et al., 1983) y en la mitocondria (Carafoli, 1982; Carafoli, et al., 1982; Fiskum, et al., 1980). Las características moleculares de los sistemas de transporte de  $Ca^{++}$  asociados con estos tres tipos de membranas celulares son diferentes:

1).- Bombas de las Membranas Superficiales .

Las membranas superficiales tienen dos tipos de bombas de  $Ca^{++}$  (Martonosi, et al., 1983).

1. Una ATPasa activada por iones de Mg y Ca con un peso molecular de 30,000 Daltons, está presente en la membrana plasmática de la mayoría de las células eucarióticas, incluyendo a las células vegetales; esta ATPasa está modulada por la calmodulina. El ejemplo mejor conocido de este tipo de bomba de  $Ca^{++}$  es la ATPasa de transporte de  $Ca^{++}$  de la membrana del eritrocito (Schatzmann, 1982).

2. El sistema de intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$  que permite la extrusión de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana celular utilizando el gradiente electroquímico del  $\text{Na}^+$  como fuente de energía. El mecanismo de intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$  no está acoplado directamente a la hidrólisis de ATP, pero el ATP puede servir como un activador fisiológico (Requena et al., 1979).

En la regulación del contenido total de  $\text{Ca}^{++}$  celular, las bombas de la membrana celular son de importancia primaria. Su actividad está ajustada para compensar el influjo de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular. En células sanguíneas sanas la bomba de  $\text{Ca}^{++}$  dependiente de ATP es suficiente para balancear el influjo relativamente lento de  $\text{Ca}^{++}$  (Schatzmann, 1982). En células excitables tales como las cardíacas ó las fibras nerviosas, ocurre un gran influjo de  $\text{Ca}^{++}$  durante la actividad, en estas células además de la bomba dependiente de ATP, también se requiere el sistema de intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$  para restaurar el contenido celular de  $\text{Ca}^{++}$  a sus niveles normales.

ii).- Bomba de  $Ca^{++}$  del Retículo Endoplásmico.

El retículo endoplásmico de la mayoría de las células eucarióticas contiene una bomba de  $Ca^{++}$  dependiente de ATP de aproximadamente 100,000 Daltons que es distinta de la ATPasa activada por  $Ca^{++}$  -  $Mg^{++}$  de la membrana de la superficie. La bomba de  $Ca^{++}$  es un componente intrínseco de la membrana del retículo endoplásmico, y en ciertas células (e.g. en células musculares) puede representar el 50 - 80% de las proteínas totales del retículo endoplásmico (Martonosi, 1982, 1983). La bomba de  $Ca^{++}$  dependiente de ATP cataliza el transporte de  $Ca^{++}$  contra su gradiente electroquímico. A diferencia de la ATPasa de  $Ca^{++}$  de la membrana celular, la enzima del retículo endoplásmico es relativamente insensible a la calmodulina. Un ejemplo bien caracterizado de esta clase de sistema de transporte de  $Ca^{++}$  es la ATPasa de transporte de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético y en el músculo cardíaco.

La concentración de  $Ca^{++}$  está controlada propiamente por el retículo endoplásmico, esto es muy evidente en el músculo esquelético, en el cual la mayor parte del  $Ca^{++}$  activado se origina en el retículo sarcoplásmico. El retículo sarcoplásmico en el músculo esquelético es una red extensamente desarrollada de túbulos y cisternas que está ordenado en una relación muy precisa con los elementos contráctiles (Franzini-Armstrong, 1980; Sommer, 1982). La densidad de sitios de transporte de  $Ca^{++}$  en la membrana del retículo sarcoplásmico es alta ( $\approx 20,000/\mu m^{-2}$ ), y la ATPasa de transporte de  $Ca^{++}$  constituye el 70 al 80 del contenido proteico de la membrana.

La actividad de transporte de  $\text{Ca}^{++}$  de fibras musculares rápidas es mucho mayor que la de las fibras musculares lentas, es decir, es aproximadamente proporcional a sus velocidades de relajación. Estas observaciones indican que la concentraciones de la ATPasa de transporte de  $\text{Ca}^{++}$  en la célula muscular está controlada por la actividad contráctil de una manera desconocida (Sommer et al., 1980)..

#### Iii).- Transporte Mitocondrial.

Las mitocondrias son capaces de acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}^{++}$  mediante un sistema de transporte activo, de afinidad moderada al  $\text{Ca}^{++}$ , cuya energía puede provenir tanto del transporte de electrones, como por la hidrólisis de ATP (Carafoli, 1982a y b; Fiskum, et al., 1980). El papel biológico del transporte mitocondrial no está claramente establecido (Carafoli, 1982a y b; Mala, 1977; Somlyo et al., 1981).

El papel fisiológico del transporte de  $\text{Ca}^{++}$  mitocondrial permanece aún desconocido. Aunque la capacidad de acumular  $\text{Ca}^{++}$  de las mitocondrias excede el total del  $\text{Ca}^{++}$  celular, la concentración libre de  $\text{Ca}^{++}$  dentro de la matriz mitocondrial es de  $1 \times 10^{-5}$  M (Denton et al., 1980; Hansford, et al., 1981) y el contenido real de  $\text{Ca}^{++}$  de la mitocondria determinado por microanálisis electrónico en músculo liso y esquelético es apenas detectable (Chiesi et al., 1981; Somlyo et al., 1981a,b,c). Este hallazgo concuerda con la afinidad relativamente baja del sistema de transporte mitocondrial para el  $\text{Ca}^{++}$  (Becker, et al., 1980; Carafoli, 1982a y b; Fiskum et al., 1980, 1982, Kitasawa, 1976; Nicholls et al., 1982). Es por eso

que en células musculares diferenciadas no es de esperarse que las mitocondrias tengan una participación importante en la regulación del  $Ca^{++}$ .

El transporte mitocondrial de  $Ca^{++}$ , puede ser un elemento importante en la homeostasis del  $Ca^{++}$  de las células con un retículo endoplásmico pobremente desarrollado y durante fases tempranas del desarrollo embrionario (antes que los sistemas de transporte de  $Ca^{++}$  de las membranas superficiales y del retículo endoplásmico estén completamente establecidos). Las mitocondrias también pueden servir como la última línea de defensa en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas relacionadas con un gran influjo de  $Ca^{++}$  a las células (e.g. fertilización del huevo, fiebre, reacciones inmunes, trauma quirúrgico insuficiencia cardiaca, etc.) al prevenir ó retardar un incremento fatal en el  $Ca^{++}$  citoplásmico después de que todos los demás mecanismos reguladores han sido saturados (Chizzonite et al., 1981; Farber, 1981).

#### 4).- ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN-CONTRACCION.

El acoplamiento excitación contracción (E-C) en las células musculares puede ser definido como la serie de reacciones que se inician con la depolarización del sarcolema y culminan en la producción de fuerza y movimiento.

La secuencia normal de eventos que conducen a la contracción de una fibra muscular de vertebrados, comienza con la propagación de un potencial de acción a lo largo del sarcolema. El cambio en el potencial de membrana de la fibra muscular produce un incremento de la concentración intracelular de  $Ca^{++}$ , y este incremento lleva a la activación del mecanismo contráctil.

#### a).-Origen del Calcio Activador en el Músculo Cardíaco.

El aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  puede ocurrir en teoría por dos mecanismos:

1. Influjo de  $Ca^{++}$  del espacio extracelular a través del sarcolema, ya sea por medio de una corriente entrante de  $Ca^{++}$ , vía canales dependientes del voltaje; o por medio del intercambio  $Na^{+} - Ca^{++}$ .
2. Por la liberación de  $Ca^{++}$  desde un depósito intracelular, probablemente el retículo sarcoplásmico.

b).- Corriente de  $Ca^{++}$  .

Beeler y Reuter (1977) propusieron un modelo para explicar el potencial de acción en el miocardio ventricular, basado en el modelo propuesto por Hodgkin - Huxley (1952) para explicar el potencial de acción nervioso. En este modelo la corriente total que fluye a través de la membrana en un momento dado, durante el potencial de acción, puede ser descrito por:

$$I = C \frac{dE}{dt} + \sum g_i (E - E_i)$$

Donde I es la corriente, C la capacitancia, y E el potencial transmembrana. En el potencial al cual la corriente llevada por la especie iónica (i) cambia de dirección (= potencial de inversión) y  $g_i$  la conductancia de la membrana para esa especie iónica. Las corrientes iónicas incluidas en el modelo de Beeler - Reuter son acarreados por  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Cl^-$ ,  $X_1$ , y  $X_2$ . En su modelo, Beeler y Reuter describieron todas las corrientes mediante fijación de voltaje de una cinética del tipo propuesto por Hodgkin y Huxley (1952). Las corrientes de  $Na^+$  y de  $K^+$  del modelo de Beeler y Reuter son similares a las descritas por Noble (1962) y Noble y Tsien (1969) para el tejido de Purkinje.

La corriente de  $Ca^{++}$ ,  $I_{Ca}$  durante el potencial de acción es el producto de una conductancia que varía con el tiempo,  $g_{Ca}$  y una fuerza electromotriz neta,  $E_i$  que es igual a la diferencia entre el potencial de membrana E, y el potencial de inversión para la corriente de  $Ca^{++}$  y  $E_{Ca^{++}}$

$$I_{Ca} = g_{Ca} (E - E_{Ca})$$

La conductancia  $g_{Ca}$  está dada por el producto de una conductancia máxima,  $\bar{g}_{Ca}$  con dos variables de conductancia sin dimensión:  $d$  y  $f$ , los cuales varían de 1 a 0 con el voltaje y con el tiempo:

$$g_{Ca}(t) = \bar{g}_{Ca} \cdot d(t) \cdot f(t)$$

Durante el potencial de acción  $I_{Ca}$  es una corriente entrante con un potencial de inversión de cerca de +40 mV. La  $I_{Ca}$  es virtualmente 0 cuando  $E$  es más negativo que -50 mV, pero cuando  $E$  se incrementa hasta aproximadamente -30 mV,  $d$ , llega a ser  $> 0$ , no instantáneamente sino con una constante de tiempo ( $\tau_d$ ) de 40 - 100 msec. Puesto que la constante de tiempo de la otra variable de la conductancia,  $f$ , ( $\tau_f$ ), es relativamente más lenta y la conductancia alcanza un pico a los 30-50 msec. para después decaer durante la fase de meseta conforme disminuye el producto  $d \cdot f$  y  $E$  se aproxima a  $E_{Ca^{++}}$ . Sin embargo, existe un intervalo de potencial de membrana en el cual, en el estado estacionario, tanto,  $d$  como  $f$  son mayores que cero. En estos potenciales de membrana en el estado estacionario,  $g_{Ca^{++}}$  es mayor que cero y por lo tanto, en ese intervalo puede haber un influjo sostenido de  $Ca^{++}$ .

La importancia de la corriente de  $Ca^{++}$  para la meseta del potencial de acción ha sido demostrada por Reuter et al. (1977), Rougier et. al. (1969), Mascher y Peper (1969) y Bealer y Reuter (1970); mientras que su participación en la contracción fué demostrada por otros investigadores (New et al., 1972; Trautwein, et

al., 1975; Beeler et al., 1970c).

c).- Intercambio  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{++}$ .

La idea de un intercambio  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{++}$  a través de la membrana celular fué propuesta originalmente para explicar los efectos de los niveles de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  extracelulares sobre la contractilidad cardíaca (Luftgau et al., 1958). En la actualidad se ha demostrado un sistema similar en una variedad de tejidos (Baker, 1972, 1976; Blaustein 1974, 1976; Mullins, et al., 1963; Vassort, et al., 1972; Chapman, et al., 1980).

Aunque el efecto de los cambios en la  $[\text{Na}^+]_o$  en la  $[\text{Ca}^{++}]_o$  sobre las respuestas contráctiles del corazón puede ser interpretada en términos de un intercambio  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$  a través del sarcolema, la evidencia real de tal sistema viene del estudio de los flujos iónicos. El influjo de  $\text{Ca}^{++}$  en reposo varía entre 13 y 48 X  $10^{-15}$  M/cm<sup>2</sup>/seg. en la aurícula de cobayo y es de cerca de  $1 \times 10^{-14}$  M/cm<sup>2</sup>/seg en el ventrículo de rana. El influjo de  $\text{Ca}^{++}$  se incrementa más o menos linealmente al aumentar la  $[\text{Ca}^{++}]_o$  (Niedergerke, 1963; Winegrad, 1965), también es incrementado por la reducción en  $[\text{Na}^+]_o$  (Langer, 1964; Niedergerke, 1963; Reuter et al., 1968), así como por maniobras experimentales que causen un aumento en la  $[\text{Na}^+]_i$  (Glitsch, et al., 1975). Esta dependencia de los movimientos de  $\text{Ca}^{++}$ , de la  $[\text{Na}^+]_o$  y de la  $[\text{Na}^+]_i$  fué examinada con más detalle por Reuter (1974); Él encontró que los movimientos de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Na}^+$  en la aurícula de cobayo estaban acoplados para producir una proporción de intercambio de dos iones de  $\text{Na}^+$  por cada ión de  $\text{Ca}^{++}$ . Estos flujos catiónicos probablemente no dependen

directamente del metabolismo porque no son afectados ni por el 2,5 dinitrofenol (DNP) ni por el cianuro, y dependenden poco de la temperatura (Reuter et al., 1968; Jundt, et al., 1975). Puede ocurrir, sin embargo, algún efecto indirecto del metabolismo parecida al encontrado en el sistema análogo, en axones gigantes del calamar (Jundt, et al., 1974).

Si dos iones de Na se intercambian por uno de Ca<sup>++</sup> por medio de un acarreador de membrana eléctricamente neutro, la concentración de equilibrio de los iones a cada lado de la membrana estaría dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{[Ca]_i}{[Na]_i^2} = \frac{[Ca]_e}{[Na]_e^2}$$

cundo se insertan en esta ecuación los valores de las concentraciones iónicas conocidas de Ca<sup>++</sup> y de Na<sup>+</sup>, la ecuación predice un nivel alto, no real, de [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> libre en el músculo en reposo. Glitsch et al. (1970) obtuvieron la evidencia que la afinidad relativa del intercambiador para el Na<sup>+</sup> y para el Ca<sup>++</sup> no es la misma en los dos lados de la membrana. Cuando se incluyó esta diferencia en la ecuación (1), disminuye la [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> predicha, pero el valor obtenido es todavía era un orden de magnitud mayor que el esperado para un músculo relajado. Una posible explicación para esta discrepancia podría ser que el intercambiador descargara hacia un compartimiento intracelular, diferente al sarcoplasma, que tuviera una concentración relativamente alta de Ca<sup>++</sup> y/o Na<sup>+</sup> en su interior. Tal compartimiento podría ser el retículo sarcoplásmico,

de tal manera que el intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$  tendría que estar restringido a las regiones de contacto entre el retículo sarcoplásmico y el sarcolema. Aunque esta hipótesis tenía algunas características interesantes, es inconsistente con el incremento en el eflujo de  $\text{Ca}^{++}$  activado por el  $\text{Na}^+$  observado en la aurícula de cobayo causado durante la exposición a la cafeína. Esta droga liberaría el  $\text{Ca}^{++}$  contenido dentro del retículo sarcoplásmico hacia el sarcoplasma y debería en términos de esta hipótesis reducir el eflujo de  $\text{Ca}^{++}$  (Jundt et al., 1975). Si el intercambio  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$  opera entre la solución de baño y el sarcoplasma, la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  podría ser controlada a un nivel real por el intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$ , si el acarreador siempre tuviera una carga eléctrica (Reuter, 1974), o si más de dos iones de  $\text{Na}^+$  se intercambian por cada ión de  $\text{Ca}^{++}$  (Blaustein, 1974; Mullins, et al., 1963). En el caso de un acarreador con carga eléctrica la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  estaba dada por la ecuación (2):

$$[\text{Ca}]_i = \left\{ \frac{K_i [\text{Ca}]_e \times [\text{Na}]_i^2}{K_e [\text{Na}]_e^2} \right\} e^{-z E_m F/RT}$$

donde  $K_i$  y  $K_e$  representan la afinidad relativa del acarreador, a cada lado del sarcolema, para el ión de  $\text{Na}$  con respecto a los iones de  $\text{Ca}$ ;  $Z$  es el número de cargas sobre el acarreador saturado;  $E_m$  es el potencial de membrana; y  $RT$  y  $F$  tienen su significado usual. Reuter (1974) calculó, mediante la ecuación (2), que si  $Z$  es igual a 2, se puede predecir una  $[\text{Ca}^{++}]_i$  menor a  $10^{-7}$  M. Si el  $\text{Ca}^{++}$  se intercambia por más de dos iones de  $\text{Na}$  entonces la  $[\text{Ca}^{++}]_i$  está dada

por la ecuación (3):

$$[Ca]_i = \left\{ \frac{K_i [Ca]_e \times [Na]_i^n}{K_e [Na]_e^n} \right\} e^{(n-2) E_m F/RT}$$

donde n es el número de iones de Na<sup>+</sup> que se intercambian por un ión de Ca. Si es igual a 3, la ecuación predice una concentración intracelular inferior de 10<sup>-7</sup> M.

d).- Liberación de Ca<sup>++</sup> del Retículo Sarcoplásmico.

La contracción del músculo esquelético se desencadena por el impulso nervioso que depolariza la membrana superficial de la célula muscular. La onda de depolarización es conducida hacia el centro de la fibra muscular por los túbulos T (Adrian, 1983; Gonzalez-Serratos, 1983; Paschey et al., 1983). Tanto los túbulos T como la membrana superficial establecen uniones especializadas (uniones T - R.S. y acoplamientos periféricos) con el retículo sarcoplásmico (Franzini-Armstrong, 1980); estas uniones están involucradas en la transmisión del estímulo excitatorio. La depolarización de los túbulos T desencadena un movimiento de carga en la estructura de unión (Gilly, 1981; Schneider, 1981), el cual, inicia la serie de eventos que culminan en la liberación del Ca<sup>++</sup>, acumulado en el retículo sarcoplásmico, hacia el citoplasma (Gilly, 1981; Schneider, 1981; Winegrad, 1982).

En comparación con la amplia información que existe sobre los mecanismos de transporte de Ca<sup>++</sup>, se sabe relativamente poco acerca de la estructura y de la función de los sistemas que participan en

el acoplamiento excitación-contracción.

El contenido de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico resulta del balance entre la velocidad de transporte desde el citoplasma a la luz del retículo sarcoplásmico y la velocidad de liberación desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma. Cuando el músculo es estimulado la liberación de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico es un proceso rápido que comienza unos cuantos msec después de la fase de ascenso del potencial de acción y termina antes de que el desarrollo de tensión alcance su valor máximo.

**Mecanismos de la transmisión de la señal eléctrica:**

Uno de los problemas no resueltos de la fisiología del músculo, es cómo ocurre la transmisión de la señal eléctrica en los acoplamientos entre el sarcolema y el retículo sarcoplásmico. Los principales mecanismos propuestos son los siguientes:

**I).- Transmisión Eléctrica:**

i).- Hipótesis del Movimiento de Cargas.- De acuerdo al modelo de Schneider-Chandler, el movimiento de cargas eléctricas en la membrana del túbulo transversal depolarizado, podría abrir un canal en la membrana del retículo sarcoplásmico, causando la liberación del  $Ca^{++}$  acumulado (Schneider, 1981; Schneider, et al., 1973; Horowitz et al., 1981a,b).

ii).- Hipótesis de la Depolarización del Retículo Sarcoplásmico. Esta hipótesis postula la depolarización de la membrana del retículo sarcoplásmico por un flujo de corriente desde la membrana de los túbulos transversales hasta la del retículo sarcoplásmico a través de

canales iónicos abiertos durante la activación (Mathias, et al., 1980, 1981). De acuerdo a esta hipótesis la depolarización abre canales de  $Ca^{++}$ , sensibles al voltaje, en la membrana del retículo sarcoplásmico, lo que causaría la liberación del  $Ca^{++}$  activador. Durante la relajación los canales iónicos se cerrarían, y el retículo sarcoplásmico sería repolarizado por la bomba electrogénica de  $Ca^{++}$ . La principal evidencia que apoya esta hipótesis es que se han registrado en músculo in vivo (Oetliker, 1982), mediante sensores ópticos cambios de potencial en el retículo sarcoplásmico durante la liberación de  $Ca^{++}$ . Por otra parte la sustitución de los aniones a los cuales la membrana del retículo sarcoplásmico es poco permeable (por ejemplo el sulfato), por aniones que penetran con mayor facilidad (por ejemplo el cloro) o la substitución de cationes a los cuales la membrana es muy permeable por ejemplo el potasio), por cationes que atraviesan la membrana con mayor facilidad depolariza al retículo sarcoplásmico y causa la liberación de  $Ca^{++}$  (Endo, 1977; Stephenson, 1982; Winegrad, 1982).

Es posible suponer que la negatividad generada en el interior del retículo sarcoplásmico en el músculo in vivo durante la liberación de  $Ca^{++}$  activador facilita la subsecuente reabsorción de  $Ca^{++}$ , la cual en cambio acelera la desaparición de dicha negatividad (Beeler, et al., 1981).

Las observaciones ya mencionadas sugieren que el retículo sarcoplásmico es depolarizado durante la activación muscular. Sin embargo, no hay evidencia de que la depolarización sea la causa de

la liberación de  $\text{Ca}^{++}$ .

11).- Transmisión Química.

De acuerdo a la hipótesis del transmisor químico, el proceso de acoplamiento excitación-contracción involucra un mediador químico difusible que induce la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico (Bianchi, 1968; Fabiato, 1982; Onhishi et al., 1981; Stephenson, 1982). No es probable que este transmisor químico sea de origen extracelular debido a que las fibras musculares esqueléticas aisladas se contraen en presencia de 80 mM de EGTA, el cual reduce la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre en el medio hasta valores inferiores a  $1 \times 10^{-11}$  M (Gilkey, et al., 1978; Miledi et al., 1984; Squire, 1981; Stefani et al., 1973, Armstrong et al., 1972).

1).- Hipótesis de la Liberación de  $\text{Ca}^{++}$  Inducida por  $\text{Ca}^{++}$ .

La hipótesis de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  en la célula muscular cardíaca del mamífero establece que la magnitud del influjo transsarcolemal de  $\text{Ca}^{++}$  es insuficiente para activar directamente a los miofilamentos y que este influjo dispara la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico. El  $\text{Ca}^{++}$  liberado activaría a los miofilamentos.

Según la hipótesis, defendida principalmente por Fabiato, el estímulo para la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  no sería directamente el cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre en el exterior del retículo sarcoplásmico ( $\Delta[\text{Ca}^{++}]_{\text{libre}}$ ), sino más bien la velocidad de cambio de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre  $\Delta[\text{Ca}^{++}]_{\text{libre}}/\Delta t$ ). Se ha sugerido (Fabiato, 1983) que el componente inicial, rápido, de la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  transsarcolemal podría ser

el estímulo fisiológico para la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$ , en tanto que el componente lento de dicha corriente recargaría el retículo sarcoplásmico con una cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  que quedaría entonces disponible para ser liberado durante los latidos subsecuentes.

Bianchi y Bolton (1966), Ford y Podolski (1970), Endo et. al. (1970), independientemente proporcionaron la primera evidencia experimental de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$ . Desde entonces la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  ha sido investigada extensivamente en fibras esqueléticas desnudas (Endo, 1981; Stephenson, 1982; Winegrad, 1982), fibras musculares cardíacas desnudas (Fabiato, et al., 1979a,b; Fabiato, 1981, 1982), y en vesículas de retículo sarcoplásmico (Bers et al., 1979; Fabiato, 1982; Miyamoto et al., 1982), pero la importancia fisiológica de este proceso aún es poco clara .

La velocidad de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  está influenciada por la concentración extravésicular de  $\text{Ca}^{++}$ , por el contenido de  $\text{Ca}^{++}$  en el retículo sarcoplásmico, por los nucleótidos de adenina, por la concentración de  $\text{Mg}^{++}$ , por la cafeína, y por los anestésicos locales.

1. Efecto de la concentración extravésicular de  $\text{Ca}^{++}$ . En fibras musculares cardíacas la concentración umbral de  $\text{Ca}^{++}$  para producir la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  a un pH de 7.1, es de  $3 \times 10^{-7}$  M. Esta concentración es más baja que la concentración umbral de  $\text{Ca}^{++}$  para activar la contracción (Fabiato, 1981); por lo tanto,

es factible que este proceso sea un paso importante en el acoplamiento excitación - contracción en el músculo cardíaco (Barlogie et al., 1971; Chapman, 1979; Fabiato et al., 1979; Fabiato, 1981).

En vesículas aisladas de retículo sarcoplásmico la dependencia de la cantidad de  $Ca^{++}$  liberado de la concentración extravesicular de  $Ca^{++}$  es altamente cooperativa y tiene un coeficiente de Hill de 4 (Mori et al., 1983).

Un aspecto muy particular de la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$ , tanto en el músculo cardíaco como en el esquelético, es que no produce una contracción máxima a pesar de que potencialmente al  $Ca^{++}$  liberado debería producir una retroalimentación positiva del mecanismo de liberación. La fuerza generada para una concentración dada de  $Ca^{++}$  extravesicular depende de la concentración de nucleótidos cíclicos (Fabiato, 1982; Winegrad, 1982).

2. Efecto del contenido de  $Ca^{++}$  en el retículo sarcoplásmico. La liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$  requiere de una cierta carga umbral de  $Ca^{++}$  y a partir de este nivel la liberación se incrementa al aumentar el contenido de  $Ca^{++}$  en el retículo sarcoplásmico (Endo, 1977; Mori et al., 1983). De acuerdo a Mori y Tonomura (1983), el  $Ca^{++}$  interno no tiene efecto sobre la activación del canal del  $Ca^{++}$ , y la velocidad de liberación de  $Ca^{++}$  a través de los canales abiertos es una simple función del gradiente del  $Ca^{++}$ . Por abajo del umbral de carga de  $Ca^{++}$ ,

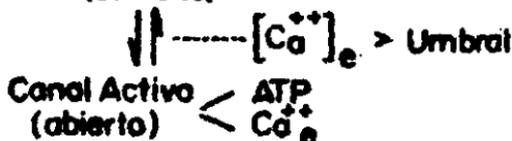
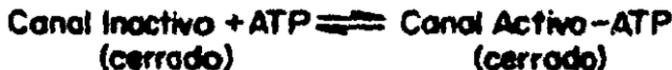
la adición extravesicular de  $\text{Ca}^{++}$ , produce únicamente captación de dicho  $\text{Ca}^{++}$ . El umbral de carga está definido por la concentración de  $\text{Mg}^{++}$ , por la presencia de moduladores (e.g. ATP, cafeína, halotano), y por la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  usada para disparar la liberación de  $\text{Ca}^{++}$ . A baja concentración de  $\text{Mg}^{++}$  y alta concentración de ATP, una alta concentración de  $\text{Ca}^{++}$  disparador pueda inducir la liberación de  $\text{Ca}^{++}$ , aún a niveles relativamente bajos de carga de  $\text{Ca}^{++}$ .

3. Activación de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  por ATP, ADP, y AMP. Los nucleótidos de adenina aumentan la velocidad de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  sin causar un cambio significativo en la afinidad de este proceso por el  $\text{Ca}^{++}$  (Endo, 1981; Endo et al., 1981; Morii et al., 1983; Nagasaki, et al., 1983; Ogawa et al., 1981, 1982). Bajo condiciones óptimas, el ATP incrementa más de 1000 veces la velocidad de liberación de  $\text{Ca}^{++}$ . La concentración de ATP necesaria para este efecto está en el orden milimolar (Endo, et al., 1981; Morii et al., 1983; Nagasaki, et al., 1983). La cafeína sensibiliza el sistema al ATP y disminuye la concentración efectiva mínima de ATP hasta un valor de  $10^{-5}$  y  $10^{-4}$  M, sin afectar la  $K_d$  aparente del ATP. El AMP y el ADP son levemente menos efectivos que el ATP en la activación del proceso de liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$ .

De acuerdo a Nagasaki et al. (1983), el ATP no afecta el mecanismo de compuerta del canal, sino que éste incrementa la conductancia del canal al fijarse a un sitio modulador que es

independiente de los sitios de fijación del  $\text{Ca}^{++}$  y de la cafeína.

Morii y Tonomura (1983) proponen que el canal del  $\text{Ca}^{++}$  puede existir en forma activa ó en forma activa. Cuando se fija un mol de nucleótido de adenina por un mol de canal, el equilibrio entre estas dos formas estaba en favor de la forma activa. Ellos proponen el siguiente modelo:



En el modelo se ha supuesto que la concentración externa de  $\text{Ca}^{++}$  no tiene efecto sobre el equilibrio entre las formas activa o inactiva del canal. Morii y Tonomura (1983) sugirieron que la compuerta del canal del  $\text{Ca}^{++}$  se abre cuando la concentración externa de  $\text{Ca}^{++}$  excede un umbral característico. La dependencia de la cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  liberado de la concentración externa de  $\text{Ca}^{++}$  no se modifica cuando varía la cantidad de  $\text{Ca}^{++}$  con la cual se ha cargado el retículo sarcoplásmico. Estas observaciones significan que ni el equilibrio entre la forma activa e inactiva de los canales, ni las propiedades abierto o cerrado de la compuerta son afectados por el  $\text{Ca}^{++}$  interno. La velocidad de liberación de  $\text{Ca}^{++}$  a través de los canales abiertos, de hecho, es proporcional al gradiente de  $\text{Ca}^{++}$ .

De acuerdo a Endo et. al. (1977), en el músculo esquelético, la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$  no se lleva a cabo en condiciones fisiológicas. Su principal objeción, es que en fibras esqueléticas desnudas, este fenómeno se obtiene únicamente con una concentración muy alta de  $Ca^{++}$  libre, una concentración muy baja de  $Mg^{++}$  y cuando el retículo sarcoplásmico ha sido precargado con  $Ca^{++}$  hasta niveles muy altos.

Sin embargo, de acuerdo a los estudios de Fabiato (1983), en la célula cardíaca, la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$ , no requiere ni una precarga elevada del retículo sarcoplásmico, ni una concentración de  $Ca^{++}$  libre mayor que el umbral para la activación de los miofilamentos, ni tampoco concentraciones de  $Mg^{++}$  mayores a las fisiológicas.

Por esta razón se propone que el proceso de liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$  pueda jugar un papel importante en el acoplamiento excitación-contracción de la fibra muscular cardíaca.

Fabiato (1983), partiendo de la observación de que la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$  en células cardíacas desnudas era dependiente de  $A[Ca^{++}]_i$  (Fabiato, et al., 1979), realizó experimentos en haces miofibrilares de a  $1 \mu m$  de diámetro y provistas de retículo sarcoplásmico, de un músculo esquelético de sacudida rápida de mamífero, (Fabiato, 1982). El objetivo de usar estas preparaciones pequeñas era lograr un cambio rápido en la concentración de  $Ca^{++}$  libre. Dicho autor encontró que era posible obtener la liberación de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico de esta

preparación al incrementar en 0.2 seg. la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre desde pCa 7.00 hasta 6.00 en la presencia de una concentración de  $\text{Mg}^{++}$  libre de 3.16  $\mu\text{M}$  y con una solución de precarga de pCa de 7.00 (Fabiato, 1982). Esta concentración de  $\text{Ca}^{++}$  disparador libre es dos a tres ordenes de magnitud más baja que aquella necesaria para inducir la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  por un incremento muy lento de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre en las fibras desnudas de músculo esquelético de anfibio de cerca de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, en presencia de una concentración más baja de  $\text{Mg}^{++}$  libre y con una precarga mayor de  $\text{Ca}^{++}$  en el retículo sarcoplásmico (Endo, 1977).

ii).- Hipótesis de la Liberación de  $\text{Ca}^{++}$  Inducida por el 1,4,5-Trifosfato de Inositol.

Se ha observado recientemente que el 1,4,5-trifosfato de inositol (Ins. 1,4,5,- $\text{P}_3$ ), moviliza  $\text{Ca}^{++}$  de depósitos intracelulares, como el retículo endoplásmico, en una variedad de tipos celulares, incluyendo células de músculo liso de la arteria coronaria porcina (Suzumatsu, et al., 1984), células cardíacas caninas (Hirata, et al., 1984), y fracciones purificadas de retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de acudida rápida de conejo. En esta última estructura se observó un efecto más pronunciado en la fracción de la cisterna terminal que contenía las estructuras llamadas "pilas" morfológicamente intactas, y además se observó que el Ins 1,4,5- $\text{P}_3$  producía desarrollo de fuerza isométrica en dichas fibras musculares esqueléticas químicamente desnudas (Volpe, et al., 1985).

El papel propuesto para el Ins (1,4,5)P<sub>3</sub>, como un segundo mensajero para la liberación de Ca<sup>++</sup> desde depósitos intracelulares se explica en el modelo propuesto por Volpe et al., (1985) como sigue: Después de la depolarización de los túbulos T (TT), se produce el Ins (1,4,5)P<sub>3</sub> en la capa mioplasmática de la membrana de los TT es liberado hacia la unión de la tríada, esto abriría canales de Ca<sup>++</sup> sensibles al Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, localizados en la región del retículo sarcoplásmico, y consecuentemente se incrementaría la concentración de Ca<sup>++</sup> libre en el sarcoplasma. Alternativamente el Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> podría inducir un aflujo pequeño de Ca<sup>++</sup> desde el retículo sarcoplásmico, éste dispararía una liberación masiva de Ca<sup>++</sup> al abrir los canales del Ca<sup>++</sup> regulados por el mismo Ca<sup>++</sup> (liberación de Ca<sup>++</sup> inducida por Ca<sup>++</sup>).

El modelo propuesto aún es altamente especulativo y algunas preguntas cruciales permanecen sin respuesta.

#### 5).- EFECTO DEL Ba<sup>++</sup>.

En trabajos publicados por Heilbrunn et al., (1947) y Fatt et al., (1958), se encontró que la inyección intracelular de los iones de Ca<sup>++</sup> causaban un inmediato y pronunciado acortamiento de las fibras musculares esqueléticas y que, a excepción del Ba<sup>++</sup>, ningún otro ión compartía esta propiedad.

Este efecto del Ca<sup>++</sup> y del Ba<sup>++</sup> también fue encontrado en el músculo liso de mamífero en el cual se observó además, que la presencia de Ca<sup>++</sup> era indispensable para que tuviera efecto la acción estimulante de la acetilcolina, de la histamina, de la

serotonina, y de la oxitocina (Yukisada, et al., 1961). En contraste con dichas drogas, el Ba++ no requería la presencia del Ca++ para ejercer su efecto estimulante, por el contrario, el Ca++ deprimía el efecto del Ba++ (Yukisada et al., 1961). En otros estudios se inyectó CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, o cafeína a fibras esqueléticas de crustáceo, y se observó que con bajas concentraciones y con dosis similares estos compuestos producían contracciones con cursos temporales semejantes (Caldwell et al., 1963; Chiarandini et al., 1970).

Posteriormente se demostró que en el músculo esquelético de la rana, el Sr++ podía reemplazar al Ca++ en cierto número de funciones relacionadas con la activación mecánica, tales como la restauración de la respuesta al K+ después de haber sido abolida en la presencia de Mn++, y la reaparición de la respuesta a la cafeína en los músculos refractarios a la cafeína por exposición repetida a ésta en ausencia de Ca++ (Lorkovic, et al., 1966). Además se reportó, que el Sr++ es acumulado por el retículo sarcoplásmico y es capaz de activar a la ATPasa miofibrilar, aunque menos efectivamente que el Ca++ (Lorkovic, et al., 1966). Papano et. al., (1969) observaron que el Ba++ y el Sr++ podían funcionar como acarreadores de carga a través de la membrana de células cardíacas de pollo cultivadas y posteriormente confirmaron que la corriente entrante lenta a través de la membrana podía ser llevada por el Ca++, el Ba++, y el Sr++. Kolhardt et. al. (1973), también demostraron que la corriente entrante lenta del Ca++, no era específica para este ión, sino que el Ba++, el Sr++, y el Mg++, podían también actuar como acarreadores

de carga.

Reuter(1974) en una revisión sobre los efectos de los iones divalentes en el corazón de mamífero, reportó que además de su efecto estabilizador, los iones divalentes podían funcionar como acarreadores de la corriente entrante lenta, y que el Ba<sup>++</sup> y el Sr<sup>++</sup> aumentaban dicha corriente.

Hagiwara et. al. (1974) al registrar en músculo esquelético corrientes de membrana a través de canales del Ca<sup>++</sup> compararon las corrientes llevadas por Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup> y Ba<sup>++</sup> y observaron que cuando estaba presente únicamente un ión divalente en el medio externo, el Ba<sup>++</sup> llevaba más corriente que el Ca<sup>++</sup> y el Sr<sup>++</sup>, y que la amplitud de las corrientes obedecía la secuencia siguiente: IBa<sup>++</sup> . ISr<sup>++</sup> . ICa<sup>++</sup>. También observaron que cuando se agregaban concentraciones relativamente altas de Co<sup>++</sup>, que es un bloqueador de los canales del Ca<sup>++</sup>, la secuencia se invertía, ICa<sup>++</sup> . ISr<sup>++</sup> . IBa<sup>++</sup>. Herasmeyer y Sperelakis (1970), demostraron que en el músculo cardíaco de la rana, el Ba<sup>++</sup> producía una disminución en la conductancia al K<sup>+</sup> y una depolarización del sarcolema. La mínima concentración de Ba<sup>++</sup> a la cual se produce una depolarización significativa y un aumento en la resistencia de entrada es de 0.1 mM. Con 10 mM de Ba<sup>++</sup>, la membrana se depolarizó hasta -30 mV y la Rin aumenta de 5 hasta 26 megohms, esto corresponde a un decremento en la conductancia al K<sup>+</sup> hasta aproximadamente 12 de su valor control.

Se han reportado conclusiones similares en diferentes preparaciones, tales como al corazón de mamífero (Reid et al., 1967), y de pollo (Papano et al., 1969), de anfibio (Toda et al., 1970), así como de fibras nerviosas (Douglas et al., 1980) y musculares esqueléticas (Hagiwara et al., 1974).

Por otro lado, también se ha observado la aparición de actividad marcapaso en el músculo cardíaco en presencia de Ba++ (Bera et al., 1983; Reid et al., 1967; Mascher, 1973) y modificaciones en los potenciales de acción. Estas modificaciones incluyen: una disminución en la velocidad de la fase de depolarización rápida del potencial de acción, un aumento en la duración del potencial de acción debida a una prolongación de la meseta y una depolarización tardía característica de los potenciales marcapaso (Toda et al., 1970; Reid et al., 1967; Papano et al., 1969).

Mascher (1973), al estudiar las respuestas mecánicas y eléctricas del corazón del gato en presencia de iones de Ba, encontró lo siguiente:

1. Una disminución en el potencial de membrana en reposo, una disminución en la pendiente de la fase de depolarización rápida del potencial de acción, un incremento en la duración del potencial de acción y la aparición de actividad marcapaso.

2. En presencia de Ba<sup>++</sup>, la respuesta mecánica asociada con el potencial de acción mostraba dos componentes distintos: Un componente inicial en forma de sacudida seguido por una fase tónica de desarrollo de la tensión.
3. La amplitud del componente de sacudida dependía del intervalo entre los estímulos y no estaba correlacionado con el curso temporal del potencial de acción asociado.
4. El curso temporal de la fase tónica de desarrollo de tensión estaba íntimamente relacionado a aquel del potencial de acción asociado.
5. La relajación de la fase tónica consistía de dos fases distintas: una fase inicial rápida seguida por una relajación lenta.
6. La velocidad de la relajación durante la fase lenta dependía de la temperatura y esta fase era abolida por debajo de 20 °C.

El mismo autor sugirió que la sacudida inicial era causada por la liberación de Ba<sup>++</sup> de un depósito intracelular, mientras que la fase tónica de desarrollo de tensión era causada por un influjo transarcolema de Ba<sup>++</sup> durante la fase de depolarización del potencial de acción. Con respecto a la fase de relajación, sugirió que estaban presentes dos diferentes procesos: el primero posiblemente relacionado con la captura de Ba<sup>++</sup> por algún depósito intracelular y el segundo por una extrusión activa de ese ión, pero

el mecanismo y estructuras involucradas era desconocido.

Slavicek (1972), fué el primero en observar en el músculo cardíaco las contracturas inducidas por Ba<sup>++</sup>. Estas se generaban por la aplicación de Ba<sup>++</sup> a preparaciones de músculo ventricular de la rata estimuladas eléctricamente y perfundidas con una solución libre de Ca<sup>++</sup> para evitar la aparición de actividad espontánea. Las contracturas eran estables y sostenidas durante un período de aproximadamente dos horas; también observó que el Ca<sup>++</sup> producía un efecto antagonista cuando se aplicaba en presencia del Ba<sup>++</sup>. Dicho autor concluyó que el Ba<sup>++</sup> era capaz de reemplazar al Ca<sup>++</sup> sólo parcialmente en el acoplamiento excitación - contracción, ya que no restauraba la contractilidad perdida por la ausencia del Ca<sup>++</sup> y en cambio producía una contractura estable y sostenida. El efecto del Ba<sup>++</sup> era revertido al retirarlo del medio.

En una comunicación preliminar, Mescher (1974), reporta que el músculo cardíaco de mamífero perfundido con una solución de Tyrode, modificada por la adición de Ba<sup>++</sup>, desarrolla una contractura lenta y sostenida cuando se disminuye la temperatura de la solución de perfusión. La velocidad del desarrollo de tensión y la tensión máxima desarrollada durante la contractura aumentan al incrementar la concentración de Ba<sup>++</sup> o al disminuir la temperatura. Al retirar el Ba<sup>++</sup> de la solución de perfusión, la tensión disminuye lentamente y alcanza los valores control después de varios minutos. La velocidad de esta relajación, aumenta cuando se incrementa la temperatura de la solución de perfusión (Q<sub>10</sub> ) 3), o cuando se

disminuye el pH de la misma.

La relajación se hace más lenta cuando se disminuye la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$ , o cuando se aumenta el pH del medio de perfusión. En presencia de quinidina la relajación no se produce, en tanto que la cafeína no modifica apreciablemente la velocidad de relajación. La velocidad de relajación no depende de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{++}$  ni es modificada por la adición de  $\text{LaCl}$  a la solución de perfusión. Con estos hallazgos el autor sugirió que la contractura es causada por la entrada de  $\text{Ba}^{++}$  del líquido extracelular al interior de la fibra que este influjo de  $\text{Ba}^{++}$  satura la capacidad de captación del sistema de relajación, y que la relajación ulterior es causada por la extrusión activa de los iones de  $\text{Ba}^{++}$  al espacio extracelular, por un mecanismo desconocido.

Steiger et. al., (1978) y Saeki et al., (1978a,b), Saeki et al., (1980); Saeki et al., (1981); Saeki et al., (1984), al estudiar las propiedades mecánicas del músculo papilar del gato y del conejo, demostraron que las contracturas inducidas al substituir el  $\text{Ca}^{++}$  de la solución de perfusión por  $\text{Ba}^{++}$ , además de ser estables, son la manifestación de un desarrollo activo de tensión y no de un estado de "rigor". Además encontraron que la concentración umbral de  $\text{Ba}^{++}$  para inducir el desarrollo de tensión es menor de 0.1 mM, que el curso temporal de la fase de ascenso del desarrollo de tensión es dependiente de la estimulación eléctrica y que la tensión máxima se alcanzaba aproximadamente a los dos minutos. Steiger et. al., (1978) sugirieron que la incapacidad del músculo cardíaco para

relajarse en presencia de Ba++ es debida a que este ión puede ser fijado al retículo sarcoplásmico, pero no trasladado.

Saeki et. al., (1984), observaron que la contractura no se desarrolla si incluyen de 300 a 500  $\mu$ M de Mn++ en el medio de perfusión con Ba++ y que la adición de Mn++, una vez que se ha desarrollado la contractura produce una relajación. Se sabe que el Mn++ bloquea específicamente la corriente entrante del Ca++, del Sr++, y del Ba++ en casi todos los tejidos excitables (Katzung et al., 1973; Kohlhardt, 1973). Según Saeki et. al., (1981), es muy probable que la contractura por Ba++ es iniciada por el paso de este ión a través del sarcolema. Estas autoras también concluyeron que la activación del sistema contráctil y la depolarización de la membrana celular son procesos independientes.

Sanborn y Langer (1974), reportaron que concomitantemente con la contractura inducida por Ba++, había una acumulación de cerca de 80 a 165  $\mu$ M de Ba++/Kg de tejido húmedo y sugirieron que la mayor parte de esta acumulación era directamente responsable de la activación contráctil observada, puesto que se sabía que el Ba++ podía interactuar con la troponina (Ebashi et al., 1968).

Raymond y Potreau (1977), y Potreau et al., (1980), al estudiar el acoplamiento excitación contracción en fibras musculares esqueléticas de sacudida rápida de la rana, observaron que después de substituir el Ca++ por Ba++, los potenciales de acción inducidos por la estimulación eléctrica aumentan en amplitud y duración, y que la contracción concomitante depende de dos mecanismos: uno era

dependiente del potencial, el otro dependiente del influjo de iones de Ba; y este último era inhibido por  $MnCl_2$  (10mM). La relación observada entre la IBA entrante y la tensión máxima se parece a aquella observada entre ICa y la contracción en otros tipos de fibras musculares. Además, observaron que la tensión relativa declina progresivamente cuando la concentración intracelular de  $Ba^{++}$  se incrementa y que la contractilidad desaparece después de una serie de pulsos depolarizantes (6 potenciales de acción por  $Ba^{++}$ ). Para ellos, esto indica que los iones de  $Ba^{++}$  entran a la célula, liberan iones de Ca y los reemplazan en los sitios intracelulares de almacenamiento. Esta interpretación es apoyada por la observación de que después de un pretratamiento con cafeína, la IBA entrante deja de inducir una contracción. Por otro lado, un músculo que ha sido cargado con  $Ba^{++}$  hasta que la contracción cesa, no desarrolla una contractura al aplicar cafeína. Estos hallazgos les sugirieron que la liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ba^{++}$  está ocurriendo en el retículo sarcoplásmico.

Hansen et. al. (1984), investigaron el mecanismo de acción del  $Ba^{++}$  en el músculo liso de la aorta de la rata, y concluyeron que el  $Ba^{++}$  atraviesa el sarcolema vía los canales del  $Ca^{++}$ , y que el  $Ba^{++}$  ejerce su efecto contráctil por la activación directa de las proteínas reguladoras. Estas autoras sugirieron que el  $Ba^{++}$  no es secuestrado en depósitos intracelulares fisiológicos porque una preparación con depleción de  $Ca^{++}$ , y después expuesta a 20mM de  $Ba^{++}$  no se restaura la respuesta contráctil a las catecolaminas.

### III).- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha demostrado experimentalmente que el Ba++ puede reemplazar al Ca++ como un acarreador de carga (Papano, et al., 1969; Kohlhardt, 1973; Papano, 1970, Toda, 1971) y como un activador de los elementos contráctiles en la fibra muscular (Caldwell et al., 1963; Fatt, et al., 1958; Heilbrunn et al., 1947; Yukisada, 1961).

Al igual que el Ca++, el Ba++ se une a la troponina y es capaz de activar a los mecanismos contráctiles, aunque con una afinidad menor (Ebashi et al. 1968). Sin embargo, a diferencia del Ca++, el Ba++ produce una contractura estable y sostenida (Slávicsek, 1972; Maschar, 1974; Saeki et al., 1978; Saeki et al., 1980; Saeki et al., 1981; Saeki et al., 1984). Los mecanismos que inducen el desarrollo de la contractura aún son desconocidos, pero podrían considerarse fundamentalmente tres posibilidades:

1. La depolarización de la membrana causada por el Ba++ podría inducir la liberación intracelular de Ca++ (de acuerdo al modelo de Schneider), y este incremento en la concentración intracelular de Ca++, llevaría al desarrollo de tensión. Este sería un mecanismo semejante al que origina el componente inicial de las contracturas inducidas por la concentración elevada de K+ en fibras musculares esqueléticas, cardíacas, y lisas.

2. El influjo transarcolemal de  $Ba^{++}$  podría inducir la liberación del  $Ca^{++}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico. El incremento en la concentración de  $Ca^{++}$  conduciría a la activación de la maquinaria contráctil. Este mecanismo sería semejante al mecanismo de liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ca^{++}$  descrito en fibras musculares esqueléticas y cardíacas.
3. El influjo transarcolemal de  $Ba^{++}$ , vía los canales del  $Ca^{++}$  voltaje dependientes, podría incrementar la concentración de  $Ba^{++}$  en el sarcoplasma hasta alcanzar la concentración umbral de  $Ba^{++}$  para inducir el desarrollo de tensión. En este caso, el  $Ba^{++}$ , al unirse a la troponina, activaría directamente a las proteínas contráctiles.

Las contracturas inducidas por  $Ba^{++}$ , a diferencia de las contracturas inducidas por cafeína o por alto  $K^+$ , (en el músculo cardíaco de mamífero) se caracterizan porque una vez que se alcanza el máximo desarrollo de tensión, éste se mantiene estable mientras persista la exposición al  $Ba^{++}$ .

Podría proponerse que en el estado estable de la contractura inducida por el  $Ba^{++}$  existe un estado de equilibrio entre los mecanismos que tienden a aumentar la concentración intracelular de cationes divalentes, y aquellos que tienden a disminuirla después de que estos últimos han sido insuficientes para mantener la contracción intracelular de dichos cationes a un nivel lo suficientemente bajo para evitar el aumento de la tensión.

La relajación, inducida al retirar el  $Ba^{++}$  del medio, indica una disminución de la concentración intracelular de cationes divalentes hasta un nivel lo suficientemente bajo para causar la relajación. Los mecanismos responsables de este proceso no han sido investigados. Es poco probable que la relajación sea originada por la salida de cationes divalentes hacia el espacio extracelular por difusión simple, puesto el  $Q_{10} \gg 3$  de la velocidad de la relajación sugieren la participación de un proceso activo en dicha relajación (Mascher 1974).

Otros mecanismos que podrían considerarse para explicar la relajación son los siguientes:

1. La captura de los cationes divalentes por estructuras intracelulares tales como el retículo sarcoplásmico y/o las mitocondrias. Este mecanismo sería similar al mecanismo de relajación en la fibra muscular cardíaca en condiciones fisiológicas.
2. La extrusión activa de dichos cationes a través del sarcolema, vía la bomba de  $Ca^{++}$  dependiente de ATP. Este mecanismo sería semejante al que se lleva a cabo para la extrusión activa del  $Ca^{++}$ , en diversos tipos de células.
3. La extrusión de los cationes divalentes a través de un intercambio con el  $Na^+$ . Este mecanismo sería similar al intercambio  $Na^+ - Ca^{++}$  estudiado bajo otras condiciones fisiológicas.

#### IV).- OBJETIVOS.

El propósito del presente estudio fué realizar un análisis experimental de las contracturas inducidas por  $Ba^{++}$  en el músculo ventricular de la rata. El estudio fué dividido en tres fases:

##### FASE I

Análisis y caracterización de las condiciones experimentales bajo las cuales se producen las contracturas inducidas por  $Ba^{++}$ . En esta fase del proyecto se intentó encontrar las condiciones experimentales óptimas para inducir las contracturas por  $Ba^{++}$  (concentración extracelular de  $Ba^{++}$ , temperatura, etc.)

##### FASE II

Análisis del mecanismo por el cual se desarrollan las contracturas inducidas por  $Ba^{++}$ . En esta fase, se intentó dilucidar si el mecanismo que induce el desarrollo de las contracturas por  $Ba^{++}$  es debido a la liberación intracelular de cationes o al influjo transarcolemal de  $Ba^{++}$  y la activación directa de las proteínas contráctiles por este ión.

### FASE III

Análisis del mecanismo y de las estructuras involucradas en la relajación de la contractura por Ba<sup>++</sup>. En esta última fase del proyecto se analizaron los posibles mecanismos que intervienen en la relajación inducida al retirar el Ba<sup>++</sup> del medio.

## V).- MATERIAL Y METODOS.

### 1).-PREPARACION:

Se utilizaron músculos papilares del ventrículo derecho de ratas Wistar, de sexo masculino y peso entre 250 y 300 g. Dichos animales fueron desnucados por un fuerte golpe en la nuca y después de una esternotomía se extrajo rápidamente el corazón, el cual se colocó en una cámara que contenía solución de Tyrode oxigenada continuamente. Mediante una incisión cuidadosa, en la cara anterior, se abrió el ventrículo derecho, y bajo observación, con un microscopio de disección, se localizó un músculo papilar apropiado, cuya longitud fuera aproximadamente de 3 a 5 mm y que no excediera de 1mm de diámetro. El extremo tendinoso del músculo se sujetó a un filamento delgado de Nylon y el extremo unido a la pared ventricular fué cortado cuidadosamente. La preparación fué trasladada a una cámara de perfusión continua donde fué montada verticalmente. El extremo inferior se fijó mediante una pinza de plata, y el extremo tendinoso fué fijado por medio del filamento de Nylon a un transductor electromecánico para medir tensión en condiciones isométricas (Grass Modelo FT03-C).

## 2).- SISTEMA DE PERFUSION Y DE CONTROL DE LA TEMPERATURA.

El sistema de perfusión y control de la temperatura se ilustra en la figura 1. La cámara de perfusión consistía en un cilindro de vidrio con un volumen de aproximadamente 0.3 ml. Las soluciones de perfusión llegaban a la cámara por gravedad desde reservorios colocados a una altura de aproximadamente 60cm y conectados a la cámara a través de tubos de polietileno los cuales, después de atravesar un dispositivo de control de temperatura, desembocaban en el fondo de la cámara. Este método de perfusión reduce los artefactos mecánicos producidos durante los cambios de solución. La solución se drenaba por desbordamiento hacia un canal unido al borde superior de la cámara y en el cual se colocaba una mecha de celulosa; esto permitía mantener constante el nivel de la solución en la cámara. La velocidad de flujo fue de aproximadamente, 20ml/min. lo que aseguraba un recambio rápido de la solución.

Con objeto de lograr cambios rápidos de la temperatura en la cámara de perfusión se utilizaron dos sistemas de perfusión independientes, cada uno de los cuales desembocaba en una llave de tres vías conectada al orificio de entrada del fondo de la cámara. Este sistema permitía seleccionar la temperatura deseada. En uno de los sistemas los tubos de polietileno atravesaban un baño provisto de control termostático, calibrado de manera que las soluciones llegaran a la cámara a una temperatura de 37°C. En el otro sistema (de temperatura baja), los tubos de polietileno pasaban por un baño, en el cual con cubos de hielo se enfriaba la solución hasta alcanzar la temperatura deseada.

### 3).- SOLUCIONES.

Las soluciones de perfusión utilizadas fueron preparadas el día del experimento a partir de soluciones madre, preparadas a partir de sales de grado analítico. La composición de las soluciones se muestra en la siguiente tabla:

COMPONENTES (mM)	TYRODE	TYRODE con Bajo Ca <sup>++</sup>	TYRODE con Bajo Ca <sup>++</sup> + BaCl <sub>2</sub>
NaCl	137	137	137
KCl	2.7	2.7	2.7
MgCl <sub>2</sub>	0.69	0.69	0.69
NaHCO <sub>3</sub>	11.9	11.9	11.9
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4	0.4	0.4
CaCl <sub>2</sub>	1.8	0.18	0.18
Glucosa	20	20	20
BaCl <sub>2</sub>	---	----	0.5 - 4

Las soluciones fueron aeradas con una mezcla de 95 por 100 de O<sub>2</sub> y 5 por 100 de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un pH de 7.4 y se mantuvieron continuamente aeradas durante la perfusión.

En los experimentos en los cuales se modificó el pH de la solución de perfusión, se substituyó el amortiguador (NaHCO<sub>3</sub> y NaHPO<sub>4</sub>) por 3 mM de Tris-Hidroximetil Amino-Metano (THAM). Estas soluciones fueron aeradas con 100 por 100 de O<sub>2</sub> y el pH se ajustó con HCl 1 N, el cual se agregó lentamente hasta alcanzar el valor de

pH deseado. Cuando se redujo la concentración de  $\text{Na}^+$  en las soluciones perfusión, el  $\text{Na}^+$  fué substituido por una cantidad osmóticamente equivalente de sacarosa.

#### 4).- SISTEMA DE REGISTRO Y DE ESTIMULACION.

El dispositivo de registro y de estimulación está ilustrado en la figura 2. La respuesta mecánica del músculo fué medida empleando un transductor electromecánico de tipo isométrico ( Grass Modelo FT03-C), amplificada con un preamplificador de DC ( Grass Modelo SP1 ) y graficada en un sistema poligráfico (Grass Modelo 5 ).

Para conocer el estado de la preparación, y para determinar la tensión isométrica máxima desarrollada durante la sacudida , se aplicó al iniciar cada experimento una estimulación de campo, mediante dos electrodos de plata que se encontraban en el interior de la cámara de perfusión. Los estímulos fueron generados por un estimulador (Grass Modelo S4 ) y aislados de tierra con una unidad aislamiento de radiofrecuencia (Grass Modelo BIU4 ). Los parámetros de los estímulos fueron: pulsos rectangulares, monofásicos, de intensidad 1.5 veces el umbral, 5 msec de duración y frecuencia de 0.15 Hz.

# SISTEMA DE PERFUSION

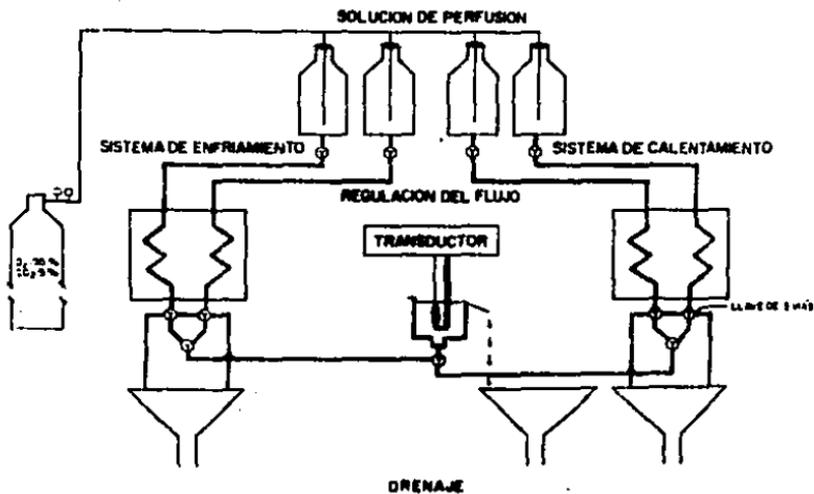


FIGURA 1

## SISTEMA DE ESTIMULACION Y REGISTRO

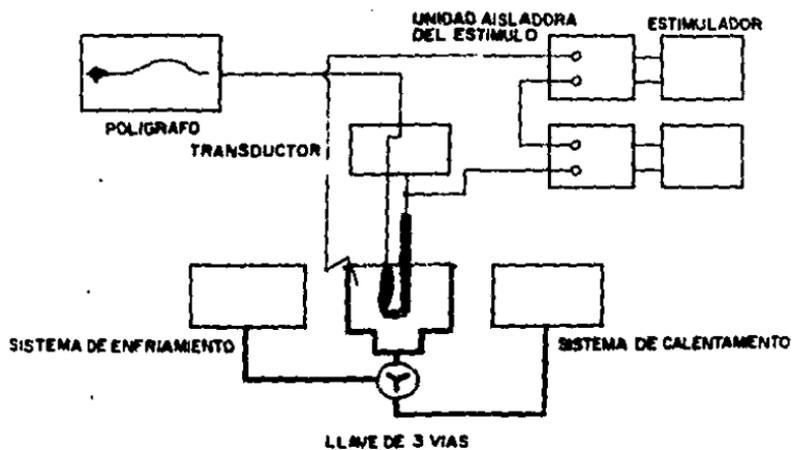


FIGURA 2

## 5).- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para inducir las contracturas por Ba<sup>++</sup>, se utilizó el siguiente diseño experimental:

paso 1: Después de colocar la preparación en el dispositivo experimental se perfundió ésta con solución de Tyrode, a una temperatura de 37°C durante por lo menos 120 min. Durante este periodo la preparación fué estimulada con los parámetros ya mencionados. Este paso tenía por objetivo asegurar la estabilización de la preparación.

paso 2: Al final del periodo de estabilización se substituyó la solución de Tyrode por una solución de Tyrode con bajo Ca<sup>++</sup> (generalmente 0.18 mM), y se esperó hasta que la amplitud de la contracción alcanzó un valor estable.

paso 3: En este paso se disminuyó la temperatura del medio de perfusión hasta el valor deseado.

paso 4: Cuando la amplitud de la contracción alcanzó de nuevo un valor estable se suspendió la estimulación eléctrica.

paso 5: 5 min. después de la suspensión de la estimulación se agregó el Ba<sup>++</sup> a la solución de perfusión para inducir la contractura.

paso 6: Una vez que la tensión durante la contractura había alcanzado un nivel estable, se cambió la solución con Ba<sup>++</sup> por una solución de Tyrode con bajo Ca<sup>++</sup>, para inducir la relajación del

músculo.

#### FASE I

Caracterización de las condiciones experimentales bajo las cuales se producen las contracturas por Ba<sup>++</sup>:

1. Efectos de la concentración de Ba<sup>++</sup>: Con el fin de determinar la relación entre la concentración de Ba<sup>++</sup> y la tensión desarrollada durante la contractura se probaron en el paso 5 de la secuencia descrita diferentes concentraciones de Ba<sup>++</sup> ( 0.5 a 4 mM ).
2. Efectos de la temperatura: En este experimento se analizaron los efectos de la temperatura sobre el desarrollo de la contractura por Ba<sup>++</sup>. Para este fin se disminuyó en el paso 3 de la secuencia descrita, la temperatura hasta diferentes valores y se mantuvo dicha temperatura en los pasos subsiguientes.
3. Efectos de la concentración de Ca<sup>++</sup>: En este experimento se estudió la influencia de la concentración externa del Ca<sup>++</sup> sobre el desarrollo de la contractura. Se exploraron tres diferentes concentraciones de Ca<sup>++</sup>: 0, 0.18, y 1.8 mM respectivamente. Cuando se estudiaron las concentraciones de 0 y 0.18 mM se disminuyó en el paso 2 de la secuencia experimental la concentración de Ca<sup>++</sup> al valor correspondiente y se mantuvo esta concentración durante los pasos subsiguientes; cuando se probó la concentración de 1.8 mM se omitió el paso 2 de la secuencia.

## FASE II

Análisis de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la contractura inducida por  $Ba^{++}$ :

1. Efectos del  $Co^{++}$ : Con el objeto de analizar el posible papel del influjo transarcolema de  $Ba^{++}$  en el desarrollo de las contracturas, se intentó suprimir dicho influjo mediante el uso del  $Co^{++}$ , el cual ha sido ampliamente utilizado como bloqueador de los canales del  $Ca^{++}$  (Kohlhardt et al., 1973). El bloqueador fué agregado al medio de perfusión en diferentes pasos del protocolo experimental.
2. Efectos de las modificaciones en el pH: Se ha reportado que la concentración de hidrogeniones ( $H^+$ ) en el medio extracelular modula el influjo de  $Ca^{++}$  a través de los canales del  $Ca^{++}$  dependientes del voltaje. La disminución de la concentración de  $H^+$  en el medio extracelular, incrementa la amplitud de la corriente de  $Ca^{++}$  y a la inversa, el incremento en la concentración de  $H^+$ , disminuye la amplitud de dicha corriente (Kohlhardt, et al., 1976; Stephen, et al., 1977). Con base en estos efectos del pH extracelular sobre el influjo transarcolema del  $Ca^{++}$ , se intentó, en el presente estudio, alterar el influjo de  $Ba^{++}$  mediante la modificación del pH del medio de perfusión. El pH fué modificado en diferentes pasos del protocolo experimental.

3. Efectos de la cafeína: En esta serie de experimentos se exploró la posible participación del retículo sarcoplásmico sobre el desarrollo de tensión inducido por el Ba<sup>++</sup>. Para ello, se utilizó como herramienta experimental la cafeína. La cafeína es un fármaco capaz de liberar el Ca<sup>++</sup> acumulado en el retículo sarcoplásmico, y, por esta acción, producir depleción del retículo sarcoplásmico de Ca<sup>++</sup> (Weber, 1968; Fabiato, 1983, 1985). Este fármaco fué aplicado en diferentes pasos del protocolo experimental.

### FASE III

Análisis de los mecanismos que intervienen en la relajación inducida al retirar el Ba<sup>++</sup> del medio.

Para este análisis se utilizó el siguiente diseño: Se indujo primero una contractura en las condiciones experimentales que en la primera fase del proyecto se encontraron como óptimas para inducirla. Una vez que la tensión durante la contractura había alcanzado un nivel estable se retiró el Ba<sup>++</sup> del medio para inducir la relajación del músculo. Una vez conocido el curso temporal de la relajación, bajo estas condiciones experimentales, se estudió el efecto de diversas modificaciones en las condiciones experimentales sobre dicho curso temporal. Las variables experimentales cuyos efectos se planeó estudiar fueron las siguientes:

1. Efecto de la temperatura: Para determinar si en la relajación inducida al retirar el  $\text{Ba}^{++}$  del medio, interviene algún proceso activo (dependiente de ATP), se estudió el efecto de las modificaciones de la temperatura sobre dicha relajación. Para cuantificar este efecto de la temperatura, se determinó el tiempo en el cual se llevaba a cabo la relajación hasta el 50 por 100 de la tensión máxima alcanzada durante la contractura (T50). Con los valores de T50 obtenidos para las diferentes temperaturas utilizadas, se determinó en forma gráfica (Figura 11) el Q10 del T50. Se ha definido el Q10 como el número de veces que se modifica un proceso al cambiar la temperatura 10°C. La determinación del Q10 no es una medida exacta de la modificación de un proceso, al cambiar la temperatura ya que su valor se modifica de acuerdo al intervalo de temperaturas utilizado para su cálculo. Sin embargo, se acepta que cuando un proceso biológico tiene un Q10  $\geq$  3, esto es indicativo de que en dicho proceso se consume energía derivada del metabolismo.
2. Efectos de la cafeína: La cafeína ha sido ampliamente utilizada para producir depleción del retículo sarcoplásmico de  $\text{Ca}^{++}$  (Fabiato, 1983, 1985; Karakí et al., 1986a; Raymond et al., 1977; Potreau et al., 1980; Weber 1968). Hasta el momento no es claro si dicha depleción se produce únicamente por la liberación del  $\text{Ca}^{++}$  acumulado en el interior del retículo sarcoplásmico o también por la inhibición de la captura de dicho ión (Weber, 1968). Además del efecto sobre el retículo sarcoplásmico, la cafeína incrementa la corriente de  $\text{Ca}^{++}$  a nivel del sarcolema.

este efecto es secundario a la inhibición de la fosfodiesterasa la cual, de una manera indirecta, incrementa el AMPc.

En esta serie de experimentos se utilizó la cafeína como una herramienta para analizar si el retículo sarcoplásmico es capaz de captar y acumular iones de  $Ba^{++}$ . En estos experimentos se intentó, como primer paso, causar depleción del retículo sarcoplásmico de  $Ca^{++}$ , por la exposición del músculo a una solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$  durante un período prolongado (por lo menos 30 min.), y la exposición subsiguiente durante 15 min. a una elevada concentración de cafeína (30 mM). Al final de este tratamiento y una vez retirada la cafeína, se indujo una contractura por la adición de  $Ba^{++}$  (4mM) a la solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$ . Cuando la tensión alcanzó su valor máximo se retiró el  $Ba^{++}$  para inducir la relajación y cuando esta relajación había progresado hasta aproximadamente el 50 por 100, se expuso la preparación a la misma dosis de cafeína utilizada para lograr la depleción de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico. Este diseño experimental permitió someter a prueba la hipótesis de que el retículo sarcoplásmico es capaz de captar y acumular el  $Ba^{++}$ . De acuerdo con esta hipótesis, la aplicación de cafeína durante la fase de relajación de la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ , después de haber inducido la depleción del retículo sarcoplásmico de  $Ca^{++}$ , debería inducir una contractura transitoria si el retículo sarcoplásmico fué capaz de acumular una parte del  $Ba^{++}$  que penetró del espacio extracelular durante la contractura, mientras que si, por el contrario, el retículo

sarcoplásmico no es capaz de acumular el  $Ba^{++}$ , la aplicación de la cafeína, bajo estas condiciones (preparación a la cual se le indujo una depleción de  $Ca^{++}$  y expuesta transitoriamente al  $Ba^{++}$ ) debería ser inefectiva.

3. Efectos de la modificación de la concentración extracelular de  $Na^{+}$ : Para analizar la posible participación de un intercambio  $Na^{+}/Ca^{++}$  a nivel del sarcolema durante la fase relajación de la contractura por  $Ba^{++}$  se disminuyó la concentración del  $Na^{+}$  en el medio de perfusión. El  $Na^{+}$  fué sustituido por una cantidad osmóticamente equivalente de sacarosa.

## VI).- RESULTADOS.

### 1).- CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CONTRACTURA INDUCIDA POR EL Ba++.

La figura 3 se ilustra un ejemplo de las contracturas inducidas por Ba++. La adición de Ba++ a la solución (Tyrode con bajo Ca++, y a baja temperatura) induce en el músculo papilar en reposo una contractura en la cual se pueden distinguir tres fases: fase de contracción, fase estacionaria, y fase de relajación. La fase de contracción se inicia aproximadamente 20 a 60 segundos después de la adición del Ba++. Durante esta fase se produce un incremento de la tensión el cual sigue un curso sigmoidal: inicialmente el incremento de tensión es lento y de poca amplitud; después se observa un incremento más rápido y más acentuado de la tensión y finalmente, una fase durante la cual el incremento de la tensión es nuevamente lento y de poca amplitud. La transición entre estas dos fases es gradual y durante la fase final la tensión se acerca asintóticamente a un valor máximo. En conjunto el desarrollo de tensión es un proceso lento y transcurren varios minutos (10 a 25, según las condiciones experimentales) antes de que la tensión alcance su valor máximo.



FIGURA 3: Contractura inducida por la adición de  $Ba^{++}$  ( $2mM$ ) a la solución de Tyrode con bajo  $Ca^{++}$  ( $0.18mM$ ) en el músculo papilar del corazón de la rata. La flecha orientada hacia arriba, indica el momento en que fué aplicado el  $Ba^{++}$ ; la flecha invertida, indica el momento en que se retiró el  $Ba^{++}$  del medio. La calibración vertical representa  $0.2$   $mN$  y la horizontal,  $1$   $min$ . Temperatura:  $20^{\circ}C$ .

Una vez alcanzada la tensión máxima, ésta se mantiene constante (fase estacionaria de la contractura) durante todo el tiempo que se mantenga el Ba++ en el medio de perfusión. Cuando el Ba++ es retirado del medio, la tensión comienza a disminuir después de una latencia de aproximadamente 1 a 2 min. (fase de relajación). Durante esta fase la tensión disminuye hasta el valor que tenía antes de la adición de Ba++. Aunque el tiempo requerido para la relajación completa varía según las condiciones experimentales, por regla general, la duración de la fase de relajación es mucho mayor que la de la fase de contracción.

a).- Reproducibilidad de los Efectos del Ba++.

La exposición repetida, de la misma preparación al Ba++ induce contracturas cuyo curso temporal y amplitud son similares mientras permanezcan constantes las condiciones experimentales; esto indica que las contracturas inducidas por bario son reproducibles. Sin embargo de una preparación a otra hay una gran variabilidad tanto en el curso temporal como en la amplitud de las contracturas inducidas bajo condiciones experimentales similares. Esta variabilidad puede atribuirse tentativamente a diferencias en el dimensiones y la geometría de las preparaciones estudiadas.

b).- Reversibilidad de los Efectos del Ba++.

Si después de haber inducido una o varias contracturas por Ba++ se regresa la preparación a las condiciones iniciales de perfusión (Tyrode con 1.8 mM de Ca++ y temperatura de 37°C) siguiendo, en orden inverso la secuencia de pasos descrita previamente (Metodos), se observa, al reiniciar la estimulación eléctrica, una reaparición inmediata de la respuesta de sacudida. Sin embargo, la amplitud de la sacudida es inicialmente pequeña y va aumentando lenta y progresivamente. Por lo general, aún después de experimentos muy prolongados (de varias horas de duración) la amplitud de la sacudida alcanza aproximadamente el 70% de la amplitud original unos 30 minutos después de regresar a las condiciones iniciales de perfusión. Estas observaciones permiten suponer que la exposición al Ba++ no altera irreversiblemente las propiedades eléctricas y mecánicas de la preparación.

c).-Efectos del Ba++ Sobre el Potencial de Membrana.

En el presente estudio sólo se hicieron registros del potencial de membrana en algunas preparaciones. En estos experimentos se observó que la adición de Ba++ a la solución de Tyrode con bajo Ca++, induce una depolarización lenta del músculo papilar en reposo. La depolarización se inicia casi inmediatamente después de aplicar el Ba++ a la solución de perfusión y alcanza su valor máximo durante el primer minuto de la exposición al Ba++. Una vez alcanzado dicho valor el potencial permanece estable durante todo el tiempo que se mantiene la exposición al Ba++. Siempre y cuando no aparezca automatismo. En presencia de Ba++, la membrana se depolariza hasta

-30 a -20 mV dependiendo de la concentración de dicho ión. Al retirar el  $Ba^{++}$  de la solución, se observó una repolarización gradual de la membrana hasta el valor de potencial previo a la adición del  $Ba^{++}$ . Por lo general, el potencial de membrana regresa a dicho valor inicial con una latencia de 1 a 2 min. que transcurre entre la suspensión de la exposición al  $Ba^{++}$  y el comienzo de la relajación.

## 2).- FASE I: CARACTERIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES BAJO LAS CUALES SE PRODUCEN LAS CONTRACTURAS POR $Ba^{++}$ .

### a).- Efecto de la Concentración de $Ba^{++}$ .

La figura 4 ilustra la respuesta mecánica de un músculo papilar sometido a la diversas concentraciones de  $Ba^{++}$  (0.5 a 4 mM) en la solución de Tyrode con bajo  $Ca^{++}$  (0.18mM). Tanto la velocidad del desarrollo de tensión durante la fase de contracción como la tensión máxima alcanzada durante la fase estacionaria de la contractura dependen de la concentración extracelular de  $Ba^{++}$ . A la concentración de 0.5 mM (la más baja utilizada en este estudio) el desarrollo de tensión es muy lento y de escasa magnitud (registro A). Al incrementar la concentración de  $Ba^{++}$ , aumenta tanto la velocidad de desarrollo de tensión como la tensión máxima desarrollada (registros B a D). Se observó, además que al incrementar la concentración de  $Ba^{++}$ , se aumentó la ocurrencia de actividad espontáneas. La tensión máxima desarrollada durante la contractura inducida por la adición de 4mM de  $Ba^{++}$  a una temperatura de 14°C fué aproximadamente 1.5 veces la tensión máxima desarrollada durante la respuesta de sacudida del mismo músculo. La máxima concentración de  $Ba^{++}$  utilizada en este estudio fué de 4mM, dado que había sido

reportado (Hermannayer, et al., 1970; Slavicek, 1972; Sasaki et al., 1978); que concentraciones mayores no inducen incrementos adicionales ni en la velocidad de desarrollo de tensión ni en la tensión máxima desarrollada.

Estos resultados indican que el grado de activación de las proteínas contráctiles, durante la contractura depende de la concentración de  $\text{Ba}^{++}$  y que a concentraciones de  $\text{Ba}^{++}$  de 4mM se produce una activación máxima de la maquinaria contráctil.

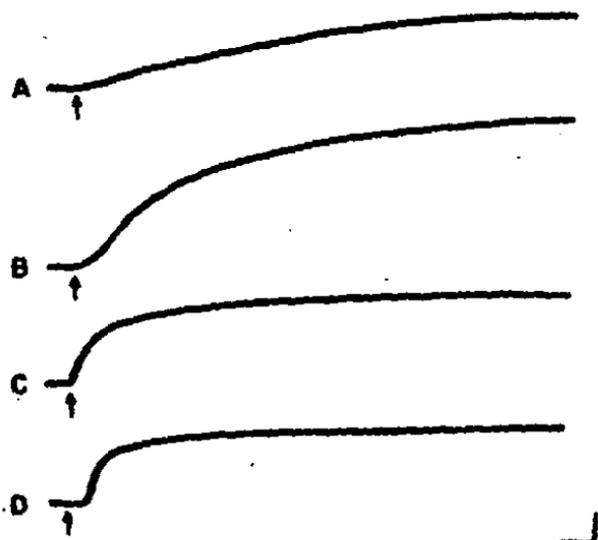


FIGURA 4: Efecto de diferentes concentraciones de  $Ba^{++}$  sobre el desarrollo de tensión. Cada uno de los trazos (A-D), muestra el incremento de la tensión inducido por la adición de  $Ba^{++}$  en el momento indicado por la flecha. Las concentraciones de  $Ba^{++}$  fueron: A=0.5mM, B=1.0mM, C=2.0mM, y D=4.0mM. La calibración vertical corresponde a 0.1mV en A y B, y 0.2mV en C y D. La calibración horizontal representa 1 min. Temperatura: 20°C; Concentración de  $Ca^{++}$ : 0.18mM.

b).- Efecto de la Temperatura.

En la figura 5 se ilustra el efecto de la modificación de la temperatura sobre el desarrollo de las contracturas inducidas por el Ba++. En esta figura se puede observar que entre 30 oC y 10 oC, la disminución de la temperatura incrementa tanto la velocidad de desarrollo de tensión como la tensión máxima desarrollada. A temperaturas inferiores a 10 oC disminuye la velocidad del desarrollo de tensión así como la magnitud de la tensión máxima desarrollada (no ilustrado). A temperaturas superiores a los 30 oC, el Ba++, generalmente no induce incremento alguno en la tensión basal, es decir, no se observa contractura y frecuentemente aparece actividad espontáneas.

En el ejemplo ilustrado en la figura 5, la tensión máxima desarrollada durante la contractura inducida a 30 oC alcanzó el 31.7 por 100 de la desarrollada durante la contractura inducida a 10.5 oC (registros A y C), mientras que la tensión máxima desarrollada a 19.8 oC alcanzó el 73 por 100 de la tensión máxima desarrollada a 10.5 oC (registros B y C). De acuerdo con estos resultados, el intervalo óptimo de temperatura para el desarrollo de las contracturas por Ba++ se encuentra entre 10 oC y 20 oC.

La mayor parte de los experimentos de este estudio se efectuaron a la temperatura ambiental (20 a 22 oC). Por un lado, a esta temperatura se obtienen contracturas cuya amplitud se consideró adecuada para el análisis que se quería hacer, y por otro lado, el trabajar a la temperatura ambiental es, técnicamente, más sencillo.

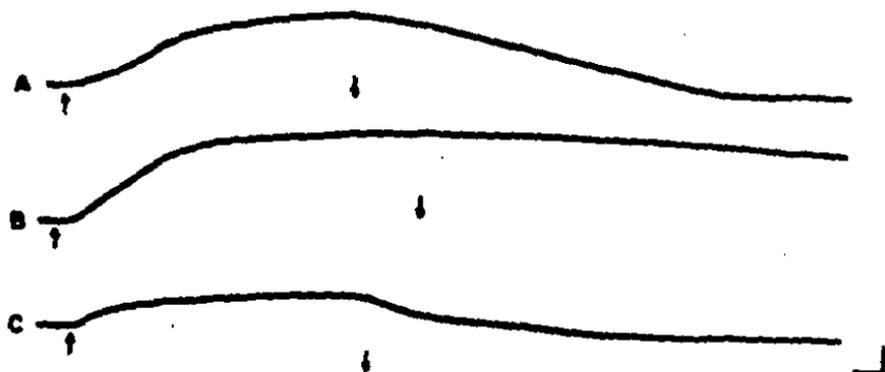


FIGURA 5. Efecto de la temperatura sobre las contracturas inducidas por el Ba<sup>++</sup>. Las temperaturas utilizadas fueron de 19.8°C, 10.5°C y 30°C (registros A, B, y C, respectivamente). La preparación fué expuesta al Ba<sup>++</sup> (2mM) durante el período comprendido entre las dos flechas. La calibración vertical corresponde a 0.1mN y la horizontal a 2 min. Concentración de Ca<sup>++</sup>: 0.18mM.

c).- Efecto de la Concentración de  $\text{Ca}^{++}$ .

La figura 6 muestra el efecto de la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{++}$  sobre el desarrollo de las contracturas por  $\text{Ba}^{++}$ . La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en la solución de Tyrode a la cual se adiciona el  $\text{Ba}^{++}$ , incrementa tanto la velocidad de desarrollo de tensión, como la tensión máxima desarrollada durante la contractura. Por otro lado, el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ , aumenta la incidencia de aparición de actividad espontánea. Diversos autores han utilizado para el estudio de las contracturas inducidas por  $\text{Ba}^{++}$ , soluciones libres de  $\text{Ca}^{++}$  ya que este procedimiento suprime la aparición de automatismo e incrementa la tensión desarrollada (Slávicek, 1972; Saeki et al., 1978). Sin embargo, Muir (1967) demostró que es necesaria una concentración mínima de  $\text{Ca}^{++}$  ( $200\mu\text{M}$ ) en el espacio extracelular para mantener íntegra la ultraestructura del disco intercalar. Por esta razón, en la mayoría de nuestros experimentos, se utilizó una concentración de  $\text{Ca}^{++}$  de  $0.18\text{ mM}$  en la solución con  $\text{Ba}^{++}$ . Con este procedimiento se intentó por un lado, disminuir al mínimo el efecto antagónico del  $\text{Ca}^{++}$  sobre el desarrollo de tensión durante la contractura inducida por el  $\text{Ba}^{++}$  y, por otro lado, asegurar en lo posible la integridad del disco intercalar y por lo tanto el acople eléctrico entre las células de la preparación.

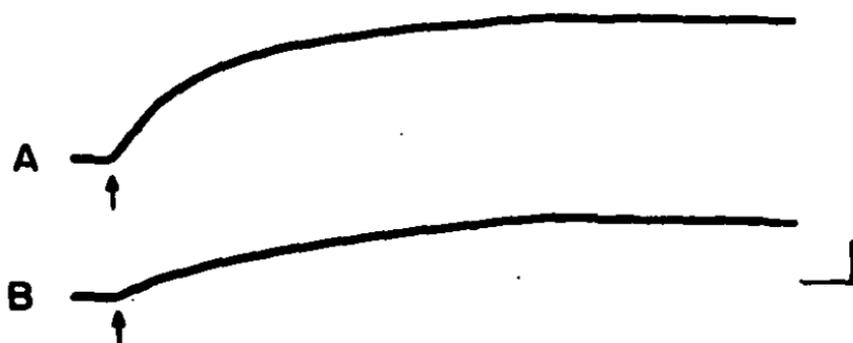


FIGURA 6. Efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  sobre el desarrollo de tensión. En A se ilustra una contractura inducida por la adición de  $\text{Ba}^{++}$  (2mM) a una solución de Tyrode con una concentración de  $\text{Ca}^{++}$  de 1.8mM. En B se ilustra una contractura inducida por la adición de 2mM de  $\text{Ba}^{++}$  (flechas horizontadas hacia arriba) a una solución de Tyrode con bajo  $\text{Ca}^{++}$  (0.18mM). La calibración vertical representa 0.2mM y la horizontal 1 min. Temperatura: 20°C.

3).- FASE II: ANALISIS DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE LAS CONTRACTURAS INDUCIDAS POR Ba++.

a).- Efecto del Co++.

La figura 7 muestra el efecto de la adición de Co++ al medio de perfusión sobre las contracturas inducidas por Ba++. El registro A muestra una contractura inducida por la adición de Ba++ en una solución de Tyrode con bajo Ca++. El registro B muestra que la adición de 2 mM de Ba++ a la solución de Tyrode con bajo Ca++ en presencia de 3 mM de Co++, no induce incremento alguno de la tensión. Este resultado indica que la presencia de Co++ previene el desarrollo de tensión inducido por la adición de Ba++. El registro C muestra el efecto de la adición de 3 mM de Co++ a la solución de Tyrode con Ba++ (y bajo Ca++) durante la fase estacionaria de la contractura, es decir, una vez que la tensión inducida por el Ba++ ha alcanzado su valor máximo. Bajo estas condiciones, el Co++ induce una relajación del músculo. Durante la relajación así inducida, la tensión disminuye hasta el valor previo a la adición del Ba++. Esta relajación es similar a la observada al retirar el Ba++ del medio, sin embargo, la tensión disminuye más rápidamente durante la relajación inducida por la adición de Co++, que durante la relajación observada en el mismo músculo al suspender la exposición al Ba++ (compárese los registros A y C). El registro D, muestra que al retirar el Co++ de la solución de Tyrode con Ba++, se produce un incremento lento y progresivo de la tensión que persiste hasta el momento en que se retira el Ba++ del medio.

Estos resultados sugieren fuertemente que el influjo transarcolemal de Ba++ vía los canales del Ca++ participa de una manera importante en el desarrollo de la contractura inducida por el Ba++.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

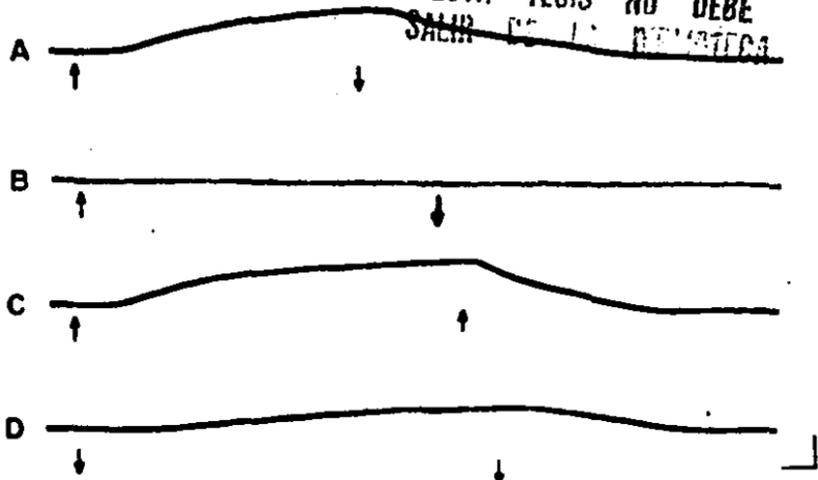


FIGURA 7. Efecto del  $Co^{++}$  sobre las contracciones inducidas por el  $Ba^{++}$ . A (contracción control), muestra la respuesta característica del músculo papilar a la adición del  $Ba^{++}$ . La preparación fué expuesta al  $Ba^{++}$  durante el período comprendido entre las dos flechas. En B, se agregó  $Co^{++}$  (3mM) en el momento indicado por la primera flecha y  $Ba^{++}$  (2mM), en el momento señalado por la segunda flecha. C muestra el efecto de la adición del  $Co^{++}$  (3mM) sobre el desarrollo de una contracción inducida por  $Ba^{++}$  (2mM). La primera flecha indica el momento en que se adicionó el  $Ba^{++}$  y la segunda el momento en que se adicionó el  $Co^{++}$ . Después de 20 min. de exposición de la preparación al  $Co^{++}$  en presencia de  $Ba^{++}$ , se procedió a retirar primero el  $Co^{++}$  y posteriormente el  $Ba^{++}$  (primera y segunda flechas respectivamente, del registro D). La calibración vertical representa 0.2mM y la horizontal a 1min. Temperatura: 20°C; Concentración de  $Ca^{++}$ : 0.18mM.

b).-Efecto de la Modificación del pH.

La figura 8 ilustra la influencia de la modificación del pH del medio externo sobre las contracturas inducidas por Ba<sup>++</sup>. A muestra una contractura inducida por Ba<sup>++</sup> a un pH de 7.4, esta contractura se tomó como control. B muestra que al repetir la exposición al Ba<sup>++</sup>, a un pH de 6.4, disminuye tanto la velocidad de desarrollo de tensión como la tensión máxima desarrollada durante la contractura. En, se muestra que la disminución del pH hasta un valor de 5.0, previene por completo el desarrollo de la contractura inducida por el Ba<sup>++</sup>. Finalmente, D, ilustra que a un pH de 8.4, la adición de Ba<sup>++</sup> induce una contractura en la cual la velocidad de desarrollo de tensión y la tensión máxima desarrollada son aproximadamente dos veces mayores que en la contractura inducida a un pH de 7.4.

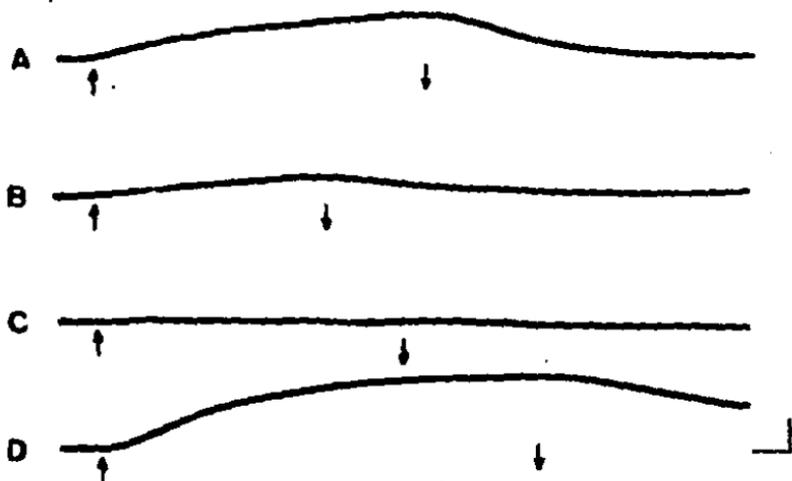


FIGURA 8. Efecto de la modificación del pH sobre las contracturas inducidas por  $Ba^{++}$ . Los valores de pH utilizados fueron: 7.4, 6.4, 5.0, y 8.4 (registros A, B, C y D, respectivamente). La preparación fué expuesta al  $Ba^{++}$  (2mM) durante el periodo comprendido entre las dos flechas. La calibración vertical es equivalente a 0.2mN y la horizontal a 1min. Temperatura: 20oC; Concentración de  $Ca^{++}$ : 0.18mM.

En otra serie de experimentos (no ilustrados), se analizó el efecto de la disminución del pH durante la fase estacionaria de la contractura. En este tipo de experimentos se observó que la disminución del pH de la solución durante la fase estacionaria de la contractura de la contractura hasta un valor de 4.0, induce una relajación completa del músculo y que al incrementar nuevamente el pH del medio, el músculo comienza a desarrollar tensión lentamente..

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la concentración de  $H^+$  modula el influjo de iones divalentes a través de los canales del  $Ca^{++}$  voltaje dependientes. De hecho los resultados observados al incrementar la concentración de  $H^+$  son muy similares a los obtenidos con el bloqueo de los canales del  $Ca^{++}$  mediante el  $Co^{++}$ . Sin embargo los efectos de la modificación del pH sobre el desarrollo de la contractura podrían ser secundarios a una modificación del pH intracelular. Como se ha reportado que la acidificación intracelular disminuye la liberación de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico, mientras que la alcalinización tiene el efecto opuesto (Fabiato, et al., 1978), se realizó la otra serie de experimentos en la cual, se investigó, si los efectos de la modificación del pH sobre el desarrollo de la contractura pueden o no ser prevenidos por la presencia de  $Co^{++}$ , es decir, si los efectos del pH persisten ó no cuando se bloquea el influjo de  $Ba^{++}$ .

La figura 9 muestra un ejemplo de esta serie de experimentos. En A se muestra una contractura inducida por  $Ba^{++}$  a un pH de 9. Durante el desarrollo de dicha contractura, se disminuyó el pH del medio

hasta el valor de 3.5, esto indujo una disminución de la tensión hasta el nivel previo a la aplicación del Ba<sup>++</sup>. Bajo esta condición experimental se aplicó Co<sup>++</sup> (3mM), y después de un período de 15 minutos se incrementó el pH del medio hasta el valor de 9, como puede observarse en B, la elevación del pH en presencia de Co<sup>++</sup> no induce cambio alguno en la tensión. C muestra que al retirar el Co<sup>++</sup> del medio, el músculo comienza a desarrollar lentamente tensión de manera que 20 minutos después de retirar el Co<sup>++</sup>, la tensión alcanzó el 66 por 100 de la tensión desarrollada durante la contractura inducida por el Ba<sup>++</sup> a un pH de 9.0.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los efectos producidos por las modificaciones en el pH del medio extracelular se pueden atribuir a una modificación en el influjo transarcolemal de Ba<sup>++</sup> a través de los canales del Ca<sup>++</sup> dependientes del voltaje.

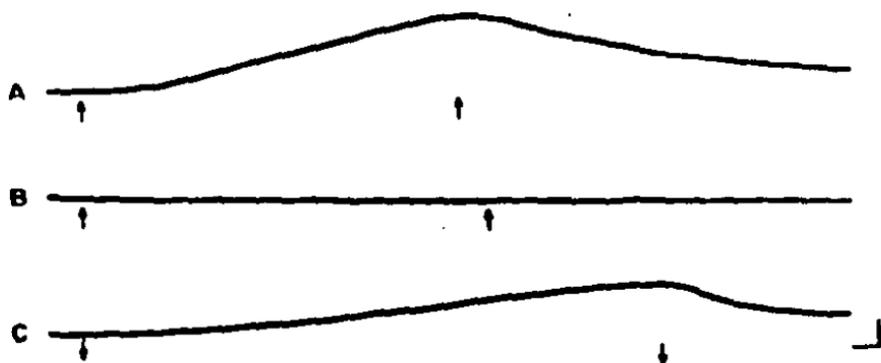


FIGURA 9. Efecto de la modificación del pH en presencia de  $\text{Co}^{++}$  (3mM). A muestra una contractura inducida por la adición de 2mM de  $\text{Ba}^{++}$  (primera flecha), a una solución de Tyrode con bajo  $\text{Ca}^{++}$  (0.18mM) y a un pH de 9.0 (el desarrollo de tensión de esta contractura es lento, debido a que la preparación había sido expuesta previamente a un pH de 5). Durante el desarrollo de esta contractura, se disminuyó el pH del medio hasta el valor de 3.5 (segunda flecha). Se agregó 3 mM de  $\text{Co}^{++}$  (primera flecha de B) y aproximadamente 10 minutos más tarde se modificó el pH hasta el valor de 9 (segunda flecha de B). C muestra que al retirar el  $\text{Co}^{++}$  del medio (primera flecha invertida), el músculo comienza a desarrollar tensión, 20 minutos más tarde se retira el  $\text{Ba}^{++}$  del medio (segunda flecha orientada hacia abajo). La calibración vertical es equivalente a 0.1mN y la horizontal a 1 min. Temperatura: 20°C; Concentración de  $\text{Ca}^{++}$ : 0.18mM.

c).- Efecto de la Cafeína.

Los resultados de los experimentos hasta aquí relatados, demuestran que la contractura inducida por la adición de Ba++ al medio externo, depende del influjo transsarcolemal de dichos iones a través de los canales del calcio activados por la depolarización de la membrana. Sin embargo, dichos datos no proporcionan información relativa a si los iones de Ba++, al unirse a la troponina, activan directamente a los filamentos contráctiles o si los iones de Ba inducen la liberación de Ca++ acumulado en el retículo sarcoplásmico.

Para analizar este problema se utilizó la cafeína. En una primera serie de experimentos se agregó la cafeína a la solución de Tyrode con bajo Ca++, y, en presencia del fármaco, se expuso la preparación al Ba++. Las concentraciones de cafeína utilizadas fueron: 1, 3, 5, y 10 mM.

Las contracturas inducidas por el Ba++ en presencia de la cafeína fueron muy similares a las inducidas en ausencia de dicha substancia, es decir que la cafeína no modifica ni el curso temporal, ni la magnitud del desarrollo de tensión. Esta observación sugiere que la liberación de Ca++ acumulado en el retículo sarcoplásmico no participa en el desarrollo de las contracturas bajo estudio.

Se consideró, sin embargo, que este tipo de experimentos no era concluyente ya que, por una parte, quedaba la posibilidad de que las concentraciones utilizadas no fueran suficientes para producir depleción de  $\text{Ca}^{++}$  al retículo sarcoplásmico, y, por la otra, no se puede descartar la posibilidad de que la presencia de 0.18 mM de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio de perfusión pueda participar en forma directa o indirecta en la activación de la contracción.

Con el objeto de obtener datos que permitieran descartar de una manera más concluyente, la participación de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  o por  $\text{Ba}^{++}$  en el desarrollo de la contractura, se realizó la siguiente serie de experimentos. En esta serie se intentó inducir la depleción del retículo sarcoplásmico de  $\text{Ca}^{++}$  antes de exponer el músculo al  $\text{Ba}^{++}$ . Para tal fin el músculo fue expuesto inicialmente a una solución libre de  $\text{Ca}^{++}$ , a la cual se le aplicaba posteriormente una dosis elevada de cafeína (30 mM). 30 minutos después de la aplicación de la cafeína, se adicionaba el  $\text{Ba}^{++}$ . La contractura inducida por el  $\text{Ba}^{++}$ , bajo estas condiciones, se comparó con la contractura obtenida previamente en el mismo músculo, por la adición de  $\text{Ba}^{++}$  a la solución de Tyrode con bajo  $\text{Ca}^{++}$ . La figura 10 ilustra un ejemplo de este tipo de experimentos. En A se ilustra la contractura inducida por la adición de  $\text{Ba}^{++}$  (4 mM) a la solución de Tyrode con bajo  $\text{Ca}^{++}$  (0.18 mM). El registro B ilustra la contractura inducida por la adición de  $\text{Ba}^{++}$  después de haber expuesto la preparación durante 30 minutos a la cafeína en la solución libre de  $\text{Ca}^{++}$ . Puede observarse que, la velocidad de desarrollo de tensión durante esta contractura es similar a la de la

contractura inducida por el Ba++ en la solución con bajo Ca++, aun que, la amplitud máxima de la contractura ilustrada en B es aproximadamente dos veces mayor que la amplitud de A. Por otro lado, también se puede observar que al retirar el Ba++ del medio (flecha hacia abajo), la velocidad de la relajación es significativamente menor que en A.

La observación de que el Ba++ induce una contractura en los músculos expuestos a una solución libre de Ca++ y a una concentración elevada de cafeína sugiere que la liberación del Ca++ acumulado en el retículo sarcoplásmico no juega un papel en el desarrollo de estas contracturas.

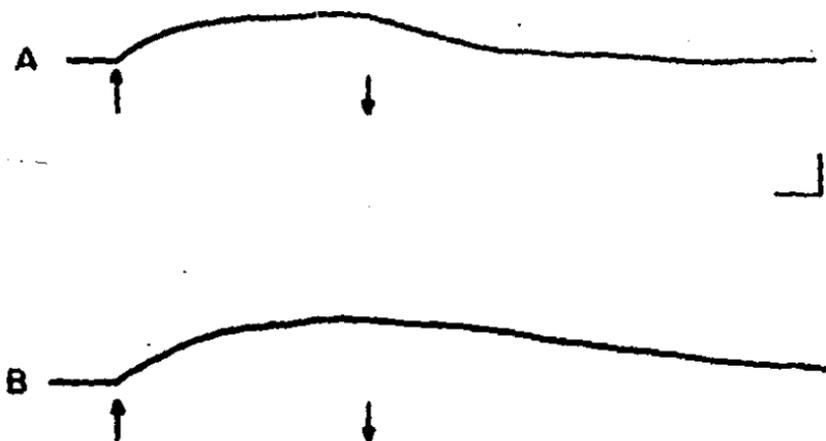


FIGURA 10. Efecto de la cafeína sobre las contracturas inducidas por Ba<sup>++</sup>. El registro A muestra una contractura inducida por la adición de 4mM de Ba<sup>++</sup> a una solución de Tyrode con bajo Ca<sup>++</sup> (0.18mM). El registro B ilustra una contractura inducida por la adición de 4mM de Ba<sup>++</sup> a una solución de Tyrode libre de Ca<sup>++</sup> y con 30mM de cafeína (la preparación permaneció expuesta antes del inicio del registro ilustrado 30 minutos a la solución libre de Ca<sup>++</sup> y 15 minutos a la cafeína). La preparación fué expuesta al Ba<sup>++</sup> durante el período comprendido entre las dos flechas de cada registro. La calibración vertical es equivalente a 0.2mM y la horizontal a 2min. Temperatura: 22°C.

Esta interpretación está basada en la hipótesis de que, a esta concentración, la cafeína es capaz de liberar todo el  $\text{Ca}^{++}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico y de evitar la reacumulación subsiguiente del  $\text{Ca}^{++}$  liberado (Endo, 1977; Fabiato, 1983, 1985; Weber, 1968). Si se acepta que en presencia de 30 mM de cafeína no puede haber liberación de  $\text{Ca}^{++}$  del retículo sarcoplásmico y, si por otra parte, la ausencia de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio de perfusión permite descartar la posibilidad de un influjo de  $\text{Ca}^{++}$  desde el medio extracelular, se puede postular que bajo estas condiciones los iones de  $\text{Ba}^{++}$  provenientes del medio externo activan directamente el mecanismo contráctil.

4).- FASE III: ANALISIS DE LOS MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA RELAJACION INDUCIDA AL RETIRAR EL  $\text{Ba}^{++}$  DEL MEDIO.

a).- Efecto de la Temperatura.

Desde la primera fase de este estudio se había observado que al bajar la temperatura del medio de perfusión, la velocidad de la relajación inducida al retirar el  $\text{Ba}^{++}$  del medio, decrecía significativamente (figura 5). En el experimento mostrado en la figura 5, se calculó un T50 de 14 min. a la temperatura de 19.8°C (registro A), un T50 de 50 min. a la temperatura de 10.5°C (registro B) y un T50 de 2 min. a la temperatura de 30°C.

En la figura 11 se ilustran los valores obtenidos al determinar el T50 de la fase de relajación en 17 experimentos realizados a diferentes temperaturas. Al ajustar un modelo linealizable a los valores de T50 a diferentes temperaturas, se encontró que  $y = \alpha e^{\beta x}$  es el mejor. Mediante el método de los mínimos cuadrados se

estimaron el intercepto y la pendiente, cuyos valores obtenidos fueron: 270.45 y 0.8565 respectivamente (según la transformación  $W = \log_{10}$ ), con un coeficiente de correlación de 0.957. La determinación del Q10 se realizó en forma gráfica a partir del ajuste a este modelo.

El análisis del efecto de la temperatura sobre la velocidad de la relajación, reveló que el T50 tiene un Q10 de 4.71 entre los 10°C y los 20°C, y un Q10 de 4.70 entre los 20°C y los 30°C.

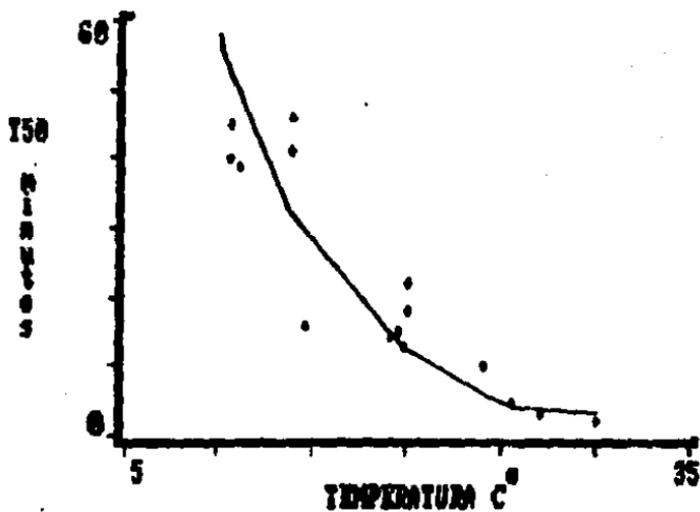
El hallazgo de que los valores del Q10 del T50 siempre fueron superiores a 3 sugiere que durante la relajación, inducida al retirar el Ba<sup>++</sup> del medio, interviene algún proceso que activamente produce la disminución de la concentración intracelular de iones divalentes (muy probablemente Ba<sup>++</sup>).

En otra serie de experimentos se observó que el incremento brusco de la temperatura, durante la fase de relajación de la contractura, induce un incremento muy marcado de la velocidad de la relajación. En la figura 12, se ilustra el efecto de un incremento de la temperatura de la solución de Tyrode con bajo Ca<sup>++</sup> sobre la velocidad de la relajación. En este experimento, se calculó un Q10 del orden de 20 para el cambio de la velocidad de relajación entre las temperaturas de 15°C y de 27°C. No existen datos experimentales que permitan explicar porqué un cambio brusco de la temperatura durante la fase de relajación produce un efecto más marcado sobre la velocidad de relajación en comparación con los efectos más moderados de la temperatura sobre la fase de relajación cuando la preparación

está equilibrada a diferentes temperaturas desde antes de la aplicación del Ba++.

El Q10 relativamente elevado de la velocidad de relajación permite descartar la hipótesis de que la relajación inducida al retirar el Ba++ del medio es causada por la difusión pasiva del Ba++ hacia el espacio extracelular y sugiere la participación de un proceso activo en la relajación. Para analizar la posible participación de retículo sarcoplásmico en la relajación se estudió en los siguientes experimentos, el efecto de la cafeína sobre la relajación de la contractura.

FIGURA 11



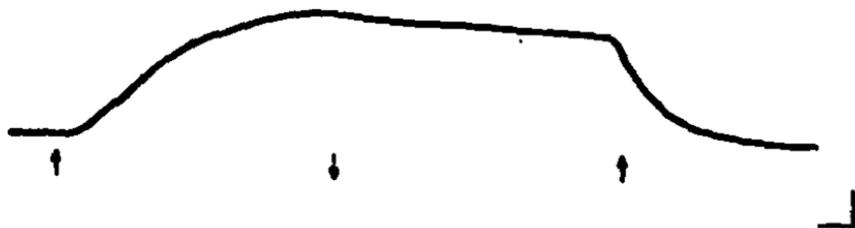


FIGURA 12.- Efecto de la elevación de la temperatura durante la fase de relajación de la contractura por Ba<sup>++</sup>. El registro ilustra una contractura inducida por 2mM de Ba<sup>++</sup> (primera flecha orientada hacia arriba) a una solución de Tyrode con bajo Ca<sup>++</sup> (0.18mM) mantenida a una temperatura de 15oC. La flecha hacia abajo indica el momento en el cual se retiró el Ba<sup>++</sup> del medio. En el momento indicado por la segunda flecha orientada hacia arriba, se elevó bruscamente la temperatura hasta 27oC. La calibración vertical es equivalente a 0.1mM y la horizontal a 1 min.

b).- Efecto de la Cafeína.

La figura 13, muestra los efectos de la cafeína sobre la fase de relajación de la contractura inducida por  $Ba^{++}$ . En A se ilustra una contractura transitoria inducida por la cafeína (30mM) a la solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$  a la cual fué expuesto el músculo durante 30 min. En B se ilustra una contractura inducida por la adición de  $Ba^{++}$  a la solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$  inmediatamente después de suspender la exposición a la cafeína. Este mismo registro ilustra que la aplicación de cafeína (30 mM), durante la relajación inducida al retirar el  $Ba^{++}$  del medio, induce una contractura transitoria durante la cual la tensión alcanza un valor similar al alcanzado durante la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ . Este último resultado apoya la hipótesis de que el retículo sarcoplásmico, es capaz de captar y acumular el  $Ba^{++}$ . Si esta interpretación es correcta, se puede postular que el retículo sarcoplásmico, participa en la relajación de la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ .

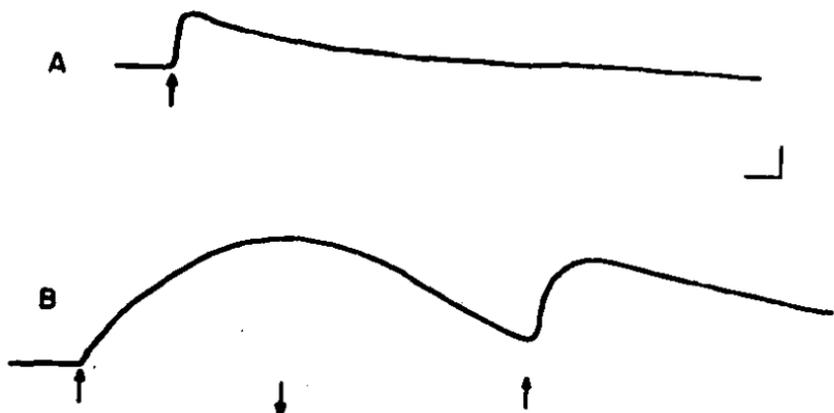


FIGURA 13. Efecto de la cafeina durante la fase de relajación de la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ . A muestra una contractura inducida por la cafeina (30mM) en un músculo papilar perfundido con una solución de Tyrode libre de  $Ca^{++}$ . La flecha orientada hacia arriba indica el momento en que fué aplicada la cafeina. En B (que es continuación del registro A), la primera flecha orientada hacia arriba indica la aplicación de 4mM de  $Ba^{++}$ . La flecha orientada hacia abajo indica el momento en el cual se retiró el  $Ba^{++}$ . En el momento señalado por la segunda flecha orientada hacia arriba se aplicó nuevamente 30mM de cafeina. La calibración vertical es equivalente a 0.2mV y la horizontal a 2min. Temperatura : 20°C.

Aunque se atribuyó la contractura inducida por la cafeína, durante la relajación de la contractura inducida previamente por el Ba++ , a un efecto de la cafeína sobre el retículo sarcoplásmico, el experimento no permite descartar un posible efecto de la cafeína a nivel del sarcolema. Como ya se mencionó, la cafeína (por su efecto inhibitorio sobre la fosfodiesterasa), incrementa los niveles de AMPc y esto, a su vez, aumenta el influjo de iones divalentes a través de los canales del calcio (Yatani, et al., 1984). La siguiente serie de experimentos, se llevó a cabo para descartar la participación de este efecto de la cafeína en la contractura inducida por este fármaco durante la relajación de la contractura inducida por el Ba++ en preparaciones a las cuales se les había producido previamente depleción de Ca++.

En estos experimentos se utilizó un protocolo muy similar al utilizado en la serie precedente, sin embargo, la relajación de la contractura inducida por el Ba++ fue inducida (en esta serie) por la adición de Co++ (3 mM) a la solución que contenía Ba++. Como se describió en la fase II de este estudio, la adición de Co++ durante la fase estacionaria de la contractura, induce la relajación completa del músculo. Esta relajación se puede atribuir al hecho de que el bloqueo de los canales del Ca++ por el cobalto inhibe el influjo de Ba++. La figura 14, muestra que la aplicación de la cafeína, durante la relajación inducida por la adición de Co++ a la solución de Tyrode libre de Ca++ y con Ba++, produce una contractura transitoria. Tanto la amplitud como el curso temporal de esta contractura fueron similares a los de la contractura inducida por la

misma concentración de cafeína, en ausencia del  $\text{Co}^{++}$  (véase el registro A).

Este resultado permite descartar que la contractura inducida por la cafeína, sea producida por el influjo de  $\text{Ba}^{++}$  desde el medio extracelular. Una vez descartado el influjo de  $\text{Ba}^{++}$  como posible origen de la contractura inducida por la cafeína se fortalece la interpretación alcanzada con los resultados de los experimentos de la serie experimental precedente, es decir, que la contractura inducida por la aplicación de cafeína durante la fase de relajación de la contractura inducida por el  $\text{Ba}^{++}$  (en preparaciones en las cuales se produjo depleción previamente del retículo sarcoplásmico de  $\text{Ca}^{++}$ ) se origina por la liberación del  $\text{Ba}^{++}$  acumulado por el retículo sarcoplásmico.



FIGURA 14. Efecto de la aplicación de cafeína durante la fase de relajación inducida por  $\text{Co}^{++}$  en las contracturas inducidas por  $\text{Ba}^{++}$ . Esta figura muestra una contractura inducida por la adición de  $4\text{mM}$  de  $\text{Ba}^{++}$  (primera flecha), a una solución de Tyrode libre de  $\text{Ca}^{++}$ . Esta contractura fué inducida bajo condiciones experimentales similares a las de la contractura ilustrada en el registro B de la figura 13. La segunda flecha señala la adición de  $3\text{mM}$  de  $\text{Co}^{++}$ . La tercera flecha indica la aplicación de  $30\text{mM}$  de cafeína. La calibración vertical es equivalente a  $0.2\text{mN}$  y la horizontal a  $2\text{ min}$ . Temperatura:  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Las figuras 10, 12 y 13 muestran otro hallazgo interesante: la velocidad de la relajación inducida al retirar el Ba++ del medio, es significativamente mayor que la velocidad de relajación durante la contractura transitoria inducida por la aplicación de cafeina durante dicha relajación. Este resultado sugiere que el retículo sarcoplásmico participa en la relajación inducida al retirar el Ba++ del medio, y apoya, por lo tanto, la conclusión de que el retículo sarcoplásmico es capaz de captar y acumular el Ba++. Por otro lado, el hecho de que la contractura inducida por la aplicación de la cafeina, durante la relajación inducida al retirar el Ba++ del medio sea transitoria (es decir que el músculo sea capaz de relajarse en presencia de cafeina) sugiere la existencia de otro mecanismo capaz de disminuir la concentración intracelular de Ba++ hasta un nivel lo suficientemente bajo para producir la relajación completa del músculo. La relajación del músculo en presencia de la cafeina podría explicarse por la existencia de este otro mecanismo.

## VII).- DISCUSION

Está bien establecido que el desarrollo de tensión en las fibras musculares depende de la concentración intracelular de iones de Ca libres. Por otro lado, también se ha demostrado que otros cationes divalentes, tales como el Ba<sup>++</sup> y el Sr<sup>++</sup> pueden reemplazar al Ca<sup>++</sup> como activadores del sistema contráctil (Heibrunn, et al., 1947; Yukisada, et al., 1963; Papano, et al., 1969; Lorkovic, et al., 1966).

El Ba<sup>++</sup> produce efectos similares a los del Ca<sup>++</sup> sobre algunas de las propiedades eléctricas y mecánicas en diferentes tipos de fibras musculares (Hagiwara, et al., 1964, 1974; Reuter, 1973), incluyendo las del músculo cardíaco (Hagiwara, et al., 1964; Mascher, 1973; Saeki et al., 1978; Toda, 1970; Steiger, et al., 1978), sin embargo, también se han observado algunas diferencias entre el Ca<sup>++</sup> y el Ba<sup>++</sup> (Hagiwara, et al., 1964; Mascher, 1973; Reuter, 1973; Toda, 1970). Así, por ejemplo, el Ba<sup>++</sup> disminuye la conductancia al K<sup>+</sup> (Hermsmeyer, et al., 1970) y depolariza la membrana en diversas células excitables (Hermsmeyer et al., 1970). En el músculo cardíaco, induce además, la aparición de actividad marcapaso. El músculo cardíaco perfundido con una solución de Tyrode, a baja temperatura y baja concentración de Ca<sup>++</sup> desarrolla una contractura estable y sostenida cuando se añade Ba<sup>++</sup> a dicho medio de perfusión (Slavicek, 1972; Mascher, 1973, 1974).

Las contracturas inducidas por el Ba<sup>++</sup>, se han utilizado ampliamente como herramienta para el estudio de las propiedades mecánicas de la fibra muscular cardíaca ( Saeki, et al., 1978; Saeki et al., 1979; Saeki et al., 1981; Saeki et al., 1984). Steiger et al., (1978), observaron que las características mecánicas del músculo cardíaco durante una contractura inducida por el Ba<sup>++</sup>, son enteramente diferentes a aquellas del músculo en rigor, pero similares a las del músculo en contractura por K<sup>+</sup> y a las del músculo glicerinado, en los cuales la activación del sistema está mediado por el calcio. Esta observación lleva a la conclusión de que durante la contractura inducida por el Ba<sup>++</sup>, hay un desarrollo activo de tensión, generado por la interacción cíclica de las cabezas de miosina con las moléculas de actina, de la misma manera, como en el caso de las contracturas mediadas por el Ca<sup>++</sup>. Sin embargo, no está claro a través de cual proceso se produce la activación del mecanismo contráctil, en el caso de las contracturas inducidas por el Ba<sup>++</sup>. Además, no se ha aclarado porque las contracturas por Ba<sup>++</sup> son sostenidas, mientras que las contracturas mediadas por el Ca<sup>++</sup> son transitorias.

La depolarización de la membrana causada por el Ba<sup>++</sup> abre los canales del Ca<sup>++</sup> dependientes del voltaje (Kohlhardt, et al., 1973), y puesto que se ha demostrado, en varios tipos de células excitables, incluyendo al músculo cardíaco, que los canales del Ca<sup>++</sup> dependientes del voltaje son más permeables al Ba<sup>++</sup> que al Ca<sup>++</sup> (Hagiwara, 1983; Yoshino, et al., 1985), la exposición del músculo cardíaco al Ba<sup>++</sup> produce un influjo de Ba<sup>++</sup> a través de dichos

canales .

Con base en estos antecedentes y en los conocimientos actuales sobre el acoplamiento entre la excitación y la contracción, la activación de la contracción durante la contractura inducida por el  $Ba^{++}$  podría explicarse por cualquiera de las tres hipótesis planteadas en la introducción de este trabajo.

La primera hipótesis que se planteó fué que la depolarización de la membrana, causada por el  $Ba^{++}$ , podría inducir la liberación del  $Ca^{++}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico. Esta hipótesis puede ser descartada en base a los siguientes resultados del presente trabajo: 1o.- La adición de  $Ba^{++}$  a la solución de perfusión en presencia de  $Co^{++}$ , al cual bloquea a los canales del  $Ca^{++}$ , previene el desarrollo de la contractura a pesar de que el cobalto , al igual que otros bloqueadores de los canales del  $Ca^{++}$ , no impide la depolarización de la membrana (Saeki, et al., 1981). 2o.- La adición de  $Co^{++}$  a la solución de perfusión durante el estado estable de la contractura induce la relajación del músculo sin producir una repolarización concomitante de la membrana, es decir, el músculo se relaja a pesar de persistir, sin modificación alguna, la depolarización. 3o.- Al incrementar la concentración de  $Ba^{++}$  (entre 0.5 y 4.0mM), aumenta progresivamente la tensión máxima desarrollada durante la contractura, mientras que dicho incremento en la concentración de  $Ba^{++}$  sólo produce un pequeño incremento adicional en el grado de depolarización, es decir, el grado de activación de la contracción no guarda relación directa con el grado

de depolarización. 4o.- Más adelante se discutirán los resultados que demuestran que la contractura se sigue observando bajo condiciones en las cuales es poco probable que se produzca liberación de  $Ca^{++}$  del retículo sarcoplásmico.

En conclusión, los resultados de este estudio indican que la depolarización por sí sola, no es suficiente para inducir la contractura. Sin embargo, la depolarización es un paso esencial en la inducción de las contracturas por  $Ba^{++}$ . En efecto, si se previene la depolarización mediante la técnica de fijación de voltaje, el músculo cardíaco permanece relajado en presencia de  $Ba^{++}$  (D. Pelzer, comunicación personal).

Las otras dos hipótesis planteadas al inicio de este estudio atribuyen al influjo de  $Ba^{++}$  a través de los canales del  $Ca^{++}$ , abiertos por la depolarización, un papel esencial en la génesis de la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ . Los resultados del presente trabajo demuestran que el desarrollo de la contractura depende del influjo de  $Ba^{++}$ . Esta aseveración está basada en los siguientes resultados: 1o.- El bloqueo de los canales del  $Ca^{++}$ , con cobalto, previene el desarrollo de la contractura. 2o.- La modificación del influjo de  $Ba^{++}$  por modificaciones en el pH del medio de perfusión produce cambios en el desarrollo de la contractura que reflejan los cambios en el influjo de  $Ba^{++}$ , causados por la modificación del pH. La disminución del pH (que causa una disminución en la corriente de  $Ca^{++}$ ) disminuye o abole la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ , mientras que, el aumento en el pH (que incrementa la corriente de

$\text{Ca}^{++}$ ) aumenta la amplitud de la contractura. 3o.- El aumento en la concentración extracelular de  $\text{Ba}^{++}$ , que al incrementar el gradiente electroquímico aumenta el influjo de  $\text{Ba}^{++}$ , produce (dentro de ciertos límites) un incremento en la tensión desarrollada durante la contractura. 4o.- El incremento en la concentración extracelular de  $\text{Ca}^{++}$ , que disminuye el influjo de  $\text{Ba}^{++}$  a través de los canales del  $\text{Ca}^{++}$  (por una competencia entre los iones de Ca y los iones de Ba), produce una disminución en la tensión desarrollada durante la contractura.

En conclusión, el influjo de  $\text{Ba}^{++}$  a través de los canales de calcio, dependientes del voltaje, es un paso esencial para producir la contractura. Una vez que el  $\text{Ba}^{++}$  ha entrado al sarcoplasma podría en teoría, activar la contracción a través de dos mecanismos. Podría movilizar  $\text{Ca}^{++}$  de algún depósito intracelular a través de un mecanismo similar al de la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$ , o podría unirse a la troponina C y activar directamente el mecanismo contráctil.

Se pueda descartar que la contractura sea inducida por una liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por un influjo de  $\text{Ca}^{++}$  desde el medio externo porque la contractura persiste en soluciones libres de calcio y porque al aumentar el calcio en la solución de perfusión disminuye la amplitud de la contractura.

Los antecedentes que llevaron a proponer la hipótesis de una liberación de calcio inducida por el influjo de  $Ba^{++}$  fueron los siguientes. En el músculo esquelético, perfundido con una solución de Tyrode en la cual se substituye al  $Ca^{++}$  externo por  $Ba^{++}$ , desaparece la respuesta de sacudida a estímulos únicos, repetidos a baja frecuencia, después de un breve período de estimulación (Potreau et al., 1980). En el músculo esquelético, no se observa una respuesta contráctil cuando se substituye el  $Ca^{++}$  por  $Ba^{++}$ , después de liberar, mediante la aplicación de cafeína, el  $Ca^{++}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico (Potreau, et al., 1980). Por último según Bolaños, et al., (1986), en la fibra muscular esquelética, desnudada químicamente, no se observa respuesta contráctil al exponerla al  $Ba^{++}$ , en un medio libre de  $Ca^{++}$ .

Cabe hacer notar que en el músculo esquelético no se ha reportado que el  $Ba^{++}$  induzca una depolarización del sarcolema, ni tampoco que el  $Ba^{++}$  induzca el desarrollo de una contractura. Se desconocen los motivos de esta diferencia notoria entre el músculo esquelético y los músculos liso y cardíaco.

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten descartar que en el músculo cardíaco, la contractura por  $Ba^{++}$ , sea inducida por una liberación de  $Ca^{++}$  inducida por  $Ba^{++}$ . En efecto, la contractura se siguió observando en las preparaciones expuestas a dosis de cafeína, que según datos experimentales reportados por diversos autores (Fabiato, 1985; Yatani, et al., 1984), liberan todo el  $Ca^{++}$  acumulado en el retículo sarcoplásmico.

Otro dato, que permite descartar que la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ba}^{++}$ , participe en el desarrollo de la contractura, es el hallazgo de que el incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio de perfusión produce una disminución en la amplitud de la contractura y no un aumento, como en el caso de las contracturas por  $\text{Ca}^{++}$ . Si la contractura inducida por  $\text{Ba}^{++}$  fuera causada por la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de un depósito intracelular, sería difícil explicar el que las contracturas inducidas por este ión sean estables y sostenidas, ya que, por una parte, todas las contracturas mediadas por  $\text{Ca}^{++}$  son transitorias (contracturas por alto  $\text{K}^+$ , por cafeína, y por bajo  $\text{Na}^+$ ), y, por otra, los estudios de Fabiato (1983), indican que el estímulo que produce la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$ , es un cambio brusco en la concentración de los iones de calcio en el medio que rodea el retículo sarcoplásmico y que un aumento lento en la concentración de  $\text{Ca}^{++}$ , por fuera del retículo sarcoplásmico, sólo estimula la acumulación de  $\text{Ca}^{++}$ , es decir, el proceso de liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por  $\text{Ca}^{++}$  es intrínsecamente un proceso fásico que no puede explicar un aumento sostenido de la tensión.

En conclusión, los resultados del presente estudio permiten descartar que la contractura sea generada por la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  inducida por el influjo de  $\text{Ba}^{++}$  desde el medio extracelular.

En la discusión previa se han dado los argumentos que permiten descartar dos de las hipótesis que se plantearon para explicar el desarrollo de las contracturas inducidas por el  $\text{Ba}^{++}$ , queda por

discutir la tercera hipótesis. Esta hipótesis plantea que la contractura es inducida por la activación directa de las proteínas contráctiles al interactuar el  $Ba^{++}$  con la troponina C. En relación con esta hipótesis conviene mencionar que el  $Ba^{++}$  puede interactuar con la troponina C, aunque ésta, tiene una afinidad menor para el  $Ba^{++}$  que para el  $Ca^{++}$  (Ebashi y Endo, 1968). Por otro lado el  $Ba^{++}$  es capaz de inducir superprecipitación de la actomiosina extraída del músculo liso (Ebashi, et al., 1967) y también de inducir una contracción del músculo liso glicerinado de la taenia coli de cobayo (Bando, et al., 1970). Sin embargo, la capacidad del  $Ba^{++}$  para activar las proteínas reguladoras de la contracción en el músculo liso de la taenia coli de cobayo es 79 veces menor que la del  $Ca^{++}$  (Bando, et al., 1970). En el músculo liso vascular, perfundido con una solución libre de  $Ca^{++}$ , el  $Ba^{++}$  puede entrar a la fibra muscular, a través de los canales del  $Ca^{++}$  dependientes del voltaje, e inducir la contracción sin movilizar el  $Ca^{++}$  acumulado en los depósitos intracelulares (Hansen, et al., 1984; Karaki, et al., 1986). Aunque en el músculo liso la regulación de la contracción por el  $Ca^{++}$ , se hace a través de la unión del  $Ca^{++}$  a la calmodulina, el sitio en el cual se une el  $Ca^{++}$  a la calmodulina, es similar al sitio en el cual se fija el  $Ca^{++}$  a la troponina (Wai Yiu Cheung, 1980). Por esta razón los datos mencionados en relación a la activación de la contracción por el  $Ba^{++}$  en el músculo liso apoyan la hipótesis de que el  $Ba^{++}$  pueda activar directamente la maquinaria contráctil del músculo cardíaco durante la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ .

Recientemente, Stephenson, et al., (1986), reportaron que la maquinaria contráctil del músculo esquelético denudado, de anfibio, puede ser activada directamente por concentraciones de  $Ba^{++}$  tan bajas como  $10\mu M$ . Este resultado apoya la interpretación cualitativa que se había propuesto para explicar las respuestas contráctiles al  $Ba^{++}$  en preparaciones intactas (Heilbrunn, et al., 1947; Caldwell, et al., 1966; Matsumura et al., 1976) y en preparaciones denudadas (Stephenson, et al., 1977a, 1977b).

Con el método utilizado en el presente estudio, no fué posible demostrar que la contractura inducida por el  $Ba^{++}$  es generada por la activación directa de la maquinaria contráctil al interactuar el  $Ba^{++}$  con la troponina. Para tal efecto sería necesario, realizar en miocitos ventriculares denudados y sin retículo sarcoplásmico funcional, experimentos del tipo de los realizados por Stephenson (1986) en fibras musculares esqueléticas. Sin embargo, los experimentos permitieron descartar que la contractura es mediada por el  $Ca^{++}$  y por lo tanto, la hipótesis de una activación directa de los elementos contráctiles por el  $Ba^{++}$ , resulta muy plausible.

Si las contracturas inducidas por el  $Ba^{++}$ , son generadas por la interacción directa de este ión con la troponina, es indispensable que se eleve la concentración intracelular de  $Ba^{++}$  hasta un nivel lo suficientemente alto para que se produzca la activación contráctil, a pesar de la baja afinidad de la troponina por el  $Ba^{++}$ . En relación a este punto, Sanborn, et al., (1974) demostraron que durante una contractura inducida por el  $Ba^{++}$ , se acumulan, en el

septum interventricular del conejo, de 80 a 165  $\mu$ M de Ba<sup>++</sup> por Kg de tejido húmedo. Esta concentración de Ba<sup>++</sup> sería suficiente para producir una activación máxima de la contracción. La estrecha relación que se observó en el presente estudio, entre la concentración de Ba<sup>++</sup> y la tensión máxima desarrollada durante la contractura, podría explicarse, de acuerdo con la hipótesis de la activación directa, suponiendo que la concentración intracelular de Ba<sup>++</sup> alcanzada durante el estado estacionario es una función del gradiente electroquímico del Ba<sup>++</sup> a través de la membrana. En cambio, con ninguna de las hipótesis alternativas se podría explicar satisfactoriamente, el incremento de la tensión desarrollada durante la contractura, al incrementar la concentración extracelular de Ba<sup>++</sup>.

Las contracturas inducidas por el Ba<sup>++</sup> se distinguen de aquellas mediadas por el Ca<sup>++</sup> por ser sostenidas y estables durante todo el tiempo que dura la exposición al Ba<sup>++</sup>. El carácter transitorio de las contracturas mediadas por el Ca<sup>++</sup> se explica porque los dos mecanismos capaces de producir la liberación del Ca<sup>++</sup> acumulado en el retículo sarcoplásmico, es decir, la liberación por depolarización y la liberación inducida por Ca<sup>++</sup>, son procesos transitorios. La liberación inducida por depolarización es transitoria porque está sujeta a un proceso de inactivación (Hodgkin et al., 1960; Gibbons et al., 1975), mientras que en la liberación inducida por Ca<sup>++</sup>, la liberación es inhibida por el Ca<sup>++</sup> liberado (Fabiato, 1983). Por otra parte, la cantidad de Ca<sup>++</sup> que puede ser liberada del retículo sarcoplásmico está limitada a la cantidad de

calcio que el retículo sarcoplásmico puede acumular, no es concebible que el proceso de liberación se mantenga por tiempos prolongados (varias horas), sin que se agote la disponibilidad de  $\text{Ca}^{++}$ . Tomando en cuenta estas consideraciones, resulta de crucial importancia, para aceptar o rechazar la hipótesis de la activación directa de la maquinaria contráctil por el  $\text{Ba}^{++}$ , analizar si esta hipótesis puede explicar el carácter sostenido de la contractura. Es bien conocido que los canales del  $\text{Ca}^{++}$  dependientes del voltaje están sujetos a inactivación. El aumento en la permeabilidad de los canales del calcio, producido por la depolarización, es un proceso transitorio que desaparece después de un tiempo relativamente breve (unas decenas de milisegundos cuando el ión permeante es el  $\text{Ba}^{++}$ ). Existe, sin embargo, una gama de valores del potencial de membrana, dentro de la cual una fracción importante de los canales del  $\text{Ca}^{++}$  permanece permeable durante el estado estacionario. Esto se debe a que, en esta región de potencial de membrana, el producto de las variables de activación y de inactivación es mayor que cero (véase la discusión del modelo de Reuter, en la introducción). El valor de potencial de membrana en el cual, en estado estacionario, es máxima la permeabilidad de la membrana al  $\text{Ca}^{++}$  (y al  $\text{Ba}^{++}$ ) es cercano a  $-20\text{mV}$ , y éste, es precisamente, el valor del potencial de membrana durante la exposición del músculo cardíaco al  $\text{Ba}^{++}$  ( $4\text{mM}$ ). En términos de la hipótesis de la activación directa de los elementos contráctiles por el  $\text{Ba}^{++}$ , esto significa que la activación de la contracción, es sostenida porque se mantiene elevada la concentración intracelular de  $\text{Ba}^{++}$ , debido al influjo sostenido de

este ión.

Otra característica, que distingue a las contracturas por el  $Ba^{++}$ , de aquellas, mediadas por el  $Ca^{++}$ , es el desarrollo sumamente lento de la tensión durante la contractura inducida por el  $Ba^{++}$ , en comparación con desarrollo más rápido de la tensión en las contracturas mediadas por el calcio. De acuerdo a la hipótesis de la activación directa del mecanismo contráctil por el  $Ba^{++}$ , este incremento lento de la tensión, se podría explicar, por un incremento gradual de la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ , a medida que se produce el influjo de  $Ba^{++}$  a través de la membrana. Este incremento lento de la concentración del catión, contrasta, con la elevación mucho más rápida, que se logra por el mecanismo de la liberación de  $Ca^{++}$ , desde el retículo sarcoplásmico, en la inmediata vecindad de los elementos contráctiles.

Si se acepta la hipótesis de que la contractura se origina porque el  $Ba^{++}$  que entra a través de los canales del calcio, abiertos por la depolarización de la membrana, interactúa directamente con la troponina C y activa la maquinaria contráctil, se puede postular, que, durante el estado estacionario de la contractura, se mantiene constante la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ , y, por lo tanto, también el grado de activación. Si esta interpretación es correcta, y, si como se discutió previamente, el influjo de  $Ba^{++}$  es constante, porque una fracción de los canales de calcio permanecen abiertos durante todo el tiempo que dura la depolarización de la membrana, se puede postular, que, durante el

estado estacionario de la contractura, debe existir un equilibrio entre el influjo de  $Ba^{++}$  (que tiende a aumentar la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ ) y los mecanismos que tienden a disminuir dicha concentración, a través de la captación del  $Ba^{++}$  y 'o a través de la extrusión del  $Ba^{++}$  hacia el líquido extracelular. Esta interpretación es apoyada, por el hallazgo de que el bloqueo del influjo de  $Ba^{++}$  por la adición de  $Co^{++}$ , durante la fase estacionaria de la contractura, induce una relajación completa del músculo. En términos de la interpretación propuesta, ésto significaría que al cesar el influjo, predominan los mecanismos que tienden a bajar la concentración intracelular de  $Ba^{++}$  y que la relajación sobreviene, cuando esta concentración disminuye por debajo de la concentración umbral para activar el mecanismo contráctil.

Los efectos observados al variar la temperatura del medio de perfusión pueden explicarse en base a la hipótesis de que la contractura se debe a un incremento en la concentración intracelular de  $Ba^{++}$  y la postulación de que la concentración intracelular de  $Ba^{++}$  está determinada por el equilibrio entre el influjo de  $Ba^{++}$  y los mecanismos que tienden a disminuir la concentración de  $Ba^{++}$ . El incremento en la tensión desarrollada durante la contractura, que se observó al disminuir la temperatura se puede explicar suponiendo que la disminución de la temperatura se deprime la eficiencia de los mecanismos (presumiblemente activos) que tienden a disminuir la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ . Esto resultaría en una concentración de  $Ba^{++}$  más alta y por lo tanto, en un incremento en la tensión. En los mismos términos, se podría explicar la ausencia

de la contractura a temperaturas superiores a los 30 °C, postulando que a estas temperaturas, los mecanismos que tienden a bajar la concentración de  $Ba^{++}$  son tan eficientes, que la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ , se mantiene por abajo de la concentración umbral para activar a los elementos contráctiles a pesar del influjo de  $Ba^{++}$ .

De acuerdo con la hipótesis discutida, se puede atribuir la relajación, inducida al retirar el  $Ba^{++}$  del medio, a una disminución gradual y progresiva de la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ . Esta disminución, se produciría debido a que la ausencia de  $Ba^{++}$  en el medio extracelular, suspende el influjo de dicho ión, con el consecuente predominio de los mecanismos que tienden a disminuir la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ .

Con respecto a los mecanismos que tienden a bajar la concentración intracelular de  $Ba^{++}$ , se pueden postular básicamente dos: la captación (y el secuestro o acumulación) del  $Ba^{++}$  por estructuras intracelulares y la salida del  $Ba^{++}$  hacia el espacio extracelular. Se puede descartar, que la relajación se produzca simplemente por la difusión pasiva del  $Ba^{++}$  hacia el líquido extracelular, porque la velocidad con la cual se relaja el músculo después de retirar el  $Ba^{++}$  del medio, muestra una dependencia muy grande de la temperatura ( $Q_{10}$  del T50 > 3). Esto no es compatible con un proceso de difusión pasiva y sugiere la participación de un proceso activo en la relajación. Por otra parte, durante la relajación inducida por el  $Co^{++}$ , en presencia de  $Ba^{++}$  a

concentraciones milimolares en el líquido extracelular, descarta completamente la hipótesis de una difusión neta del Ba<sup>++</sup> desde el líquido intracelular hacia el líquido extracelular.

En relación a la captación y acumulación del Ba<sup>++</sup> por alguna estructura intracelular, se puede postular al retículo sarcoplásmico como la estructura que, con mayor probabilidad, pudiera llevar a cabo esta función. Sin embargo, en la literatura existe controversia en relación a la pregunta de si el retículo sarcoplásmico puede o no, captar al Ba<sup>++</sup>. Los resultados del presente estudio sugieren que el retículo sarcoplásmico puede captar y acumular el Ba<sup>++</sup>. Esta aseveración se basa en la observación de que la cafeína es capaz de inducir una contractura transitoria durante la fase de relajación de una contractura inducida por el Ba<sup>++</sup>, en preparaciones perfundidas con una solución libre de Ca<sup>++</sup>, y previamente sometidas a un tratamiento considerado, por varios investigadores (Fabiato, 1985), como eficaz para liberar el Ca<sup>++</sup> acumulado en el retículo sarcoplásmico y así producir una depleción de este ión en dicho retículo. La posible participación del retículo sarcoplásmico en la fase de relajación de la contractura es sugerida, también, por la observación de que en presencia de cafeína disminuye significativamente la velocidad de la relajación inducida al retirar el Ba<sup>++</sup> del medio.

Sin embargo, aunque el retículo sarcoplásmico pueda captar y acumular el Ba<sup>++</sup>, su capacidad para acumular dicho ión debe tener un límite. Es muy probable, que durante una exposición prolongada al

Ba<sup>++</sup> se satura la capacidad del retículo sarcoplásmico para acumular el Ba<sup>++</sup>, ya que (según se discutió previamente), bajo esta condición, se produce un influjo continuo de Ba<sup>++</sup>. Puesto que, durante una exposición prolongada al Ba<sup>++</sup>, la tensión se mantiene estacionaria (a pesar de la posible saturación del retículo sarcoplásmico) se puede postular, que debe existir algún otro mecanismo, que tienda a bajar la concentración intracelular de Ba<sup>++</sup> y que durante el estado estacionario de la contractura se mantiene constante la concentración intracelular de Ba<sup>++</sup>, porque se establezca un equilibrio entre la actividad de este hipotético mecanismo y el influjo de Ba<sup>++</sup>. La hipótesis de que la captación de Ba<sup>++</sup> por el retículo sarcoplásmico no es el único mecanismo que participa en la relajación, está acorde con la observación de que la relajación inducida al retirar el Ba<sup>++</sup> del medio, se observa también en presencia de dosis altas (30mM) de cafeína, las cuales, presumiblemente, impiden la captación de Ba<sup>++</sup>. Por otra parte, en el músculo cardíaco la contractura inducida por la cafeína es siempre transitoria, esto indica que el músculo cardíaco se puede relajar a pesar de la exclusión funcional del retículo sarcoplásmico por la presencia de la cafeína. Esta observación apoya la hipótesis de que debe existir algún mecanismo adicional capaz de disminuir la concentración intracelular de Ba<sup>++</sup> hasta niveles inferiores al umbral para activar el mecanismo contráctil. Este mecanismo adicional podría ser la salida del Ba<sup>++</sup> hacia el líquido extracelular a través de un intercambio Na<sup>+</sup>-Ba<sup>++</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no se observó ninguna modificación significativa

de la fase de relajación, cuando se modificó la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$ . La fase de relajación tampoco se modificó por la adición de quinidina, la cual es un fármaco capaz de inhibir el intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{++}$  (Mentrard et al., 1984). Estos resultados negativos, sugieren, que el intercambio  $\text{Na}^+-\text{Ba}^{++}$ , no participa de manera importante, en la relajación inducida al retirar el  $\text{Ba}^{++}$  del medio.

Otra posible vía para la salida del  $\text{Ba}^{++}$ , a través del sarcolema, sería la extrusión activa del  $\text{Ba}^{++}$ , hacia el líquido extracelular. Si, como se sugirió previamente, durante la fase estacionaria de la contractura está saturada la capacidad del retículo sarcoplásmico para acumular  $\text{Ba}^{++}$ , la relajación, inducida al retirar el  $\text{Ba}^{++}$  del medio, podría reflejar la extrusión activa del  $\text{Ba}^{++}$  hacia el líquido extracelular. Esta interpretación podría explicar el Q10 relativamente elevado del T50. Para confirmar o descartar esta interpretación, será necesario el diseño y la realización de nuevos experimentos que permitan estudiar los efectos de la temperatura sobre la fase de relajación, bajo condiciones en las cuales, se pueda descartar con mayor certeza la posible participación del retículo sarcoplásmico.

VIII).- REFERENCIAS.

1. Adrian R.H. Electrical properties of striated muscle. In: Handbook of Physiol. Skeletal muscle Edited by L. D. Peachy and R. H. Adrian Bethesda, M.D.: Am. Physiol. Soc. 1983, sect.10, chapt.10, p.275-300.
2. Armstrong, C. M., F. M. Bessanilla, and P. Horowicz. Twitches in the presence of ethylene glycol bis C B-aminoethyl ether- N, N<sub>2</sub>-Tetracetic acid. Biochim. Biophys. Acta. 267, 605-608, 1972.
3. Ashley, C. C., and E. B. Ridway. Simultaneous recording of membrane potential, calcium transient and tension in single muscle fibres. Nature. 219, 1168-1169, 1968.
4. Baker, P.F. Transport and metabolism of calcium ion in nerve. Prog. Biophys. Molec. Biol. 24, 177-223, 1972.
5. Baker, P.F. The regulation of intracellular calcium. Syn. Soc. exp. Biol. XXX, 67-88, 1976.
6. Bando, T., M. Aizu, U. Sakato, and M. Yanagisawa. Pharmacology of divalent ions on smooth muscle. Folia Pharmac. Jpn. 66, 89, 1970.
7. Berlogie, B., W. Hasselbach and A. Makinose. Activation of calcium efflux by ADP and inorganic phosphate. FEBS. Lett. 12, 267-268, 1971.
8. Baylor, S.M. Optical studies of excitation - contraction coupling using voltage-sensitive and calcium-sensitive probes. In: Handbook of Physiol. Skeletal Muscle. Edited by L.D. Peachy and R.H. Adrian. Bethesda, M.D., Am. Physiol. Soc. 1983, sect.10, chapt.13, p.355-379.
9. Baylor, S.M., W.K. Chandler, and M.W. Marshall. Use of metallochromic dyes to measure changes in myoplasmatic calcium during activity in frog skeletal muscle fibres. J. Physiol. Lond. 331, 139-177, 1982.

10. Becker G.L., G.Fiskum and A.L.Lehninger. Regulation of free  $Ca^{++}$  by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J.Biol. Chem.* 255, 9009-9012, 1980.
11. Beeler, G.W., and H.Reuter. Membrane calcium current in ventricular myocardial fibres. *J.Physiol.* 207, 191-209, 1970.
12. Beeler, G.W., and H.Reuter. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. *J.Physiol. Lund.* 268, 177-210, 1977.
13. Beeler, T.J., R.H. Farnen and A.N.Martonosi. The mechanism of voltage sensitive dye responses on sarcoplasmic reticulum. *J.Membr. Biol.* 62, 113-137, 1981.
14. Bendall, J.R. Muscle relaxing factor. *Nature* 181, 1188-1190, 1958.
15. Bennett, H.S., and K.R. Porter. An electron microscope study of sections of breast muscle of the domestic fowl. *Am. J.Anat.* 93, 61-105, 1953.
16. Bers, D.M. Early transient depletion of extracellular  $Ca^{++}$  during individual cardiac muscle contractions. *Am. J.Physiol.* 244 (Heart Circ. Physiol.13), H462-H468, 1983.
17. Bers, D.M. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am. J.Physiol.* 248 (Heart Circ. Physiol. 17), H366-H381, 1985.
18. Bers, D.M. and G. A. Langer. Uncoupling cation effects on cardiac contractility and sarcolemmal  $Ca^{++}$  binding. *Am. J.Physiol.* 224(Heart Circ. Physiol.6), H332-H341, 1979.
19. Bianchi, C.P. Cell-Calcium. Appleton. Century-Crofts, New York, 1968.
20. Bianchi, C.P., and T.C. Bolton. Effect of thiocyanate on radio calcium uptake during potassium contracture of frog sartorius muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 151, 456-463, 1966.
21. Bianchi C.P., and S.Narayan. Muscle fatigue and the role of transverse tubules. *Science* 215, 295-296, 1982.
22. Blaustein M.P. The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70, 33-82, 1974.
23. Blaustein M.P. The ins and outs of calcium transport in squid axons, internal and external ion activation of calcium efflux. *Fed. Proc.* 35, 2574-2578, 1976.

24. Blinks, J.R., P.H. Mattingly, B.R. Jewell, M. Van Leeuwen, G.C. Barrer, and D.G. Allen. Practical aspects of the use of aequorin as a calcium indicator: assay, preparation, microinjection and interpretation of signals. *Methods Enzymol.* 57, 292-328, 1978.
25. Blinks J.R., W.G. Wier, P. Hess, and F.G. Prendergast. Measurement of calcium concentration in living cells. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 40, 1-114, 1982.
26. Bolanos P., C. Caputo, and L. Velaz. Effects of calcium, barium and lanthanum on depolarization-contraction coupling in skeletal muscle fibres of *Rana Pipiens*. *J. Physiol.* 370, 39-60, 1986.
27. Borle, A.B. Control, modulation and regulation of cell calcium. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 90, 13-153, 1981.
28. Brady A.J. Onset of contractility in cardiac muscle. *J. Physiol.* 184, 560-580, 1966.
29. Bussälen, P., and E. van Kerkhove. The effects of low external sodium on contracture tension and  $Ca^{++}$  movements in the gold fish ventricle. *Arch. int. Physiol. Biochim.* 83, 337-340, 1975.
30. Caldwell F.C., and G. Walster. Studies on the microinjection of various substances into crab muscle fibres. *J. Physiol. Lond.* 169, 353-372, 1963.
31. Carafoli, E. The transport of calcium across the inner membrane of mitochondria. In: *Membrane transport of calcium*, edited by E. Carafoli. New York: New York: Academic. 1982a, p. 109-117.
32. Carafoli, E. The transport of  $Ca^{++}$  by mitochondria. In: *Membranes and transport* edited by A. Martonosi. New York: Plenum, vol. 1, p. 611-616, 1982b.
33. Carafoli, E. and A. Scarpa (editors). *Transport ATPases*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 402, 1-604, 1982.
34. Cavellif A., R. Ochi, D. Pelsar, W. Trautwein. Elementary currents through  $Ca^{++}$  channels in guinea pig myocytes. *Pfugers Arch.* 398, 284-297, 1983.
35. Chapman, R.A. Excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 35, 1-52, 1979.
36. Chapman, R.A., and J. Tunstall. The interaction of sodium and calcium ions at the cell membrane and the control of contractile strength in frog atrial muscle. *J. Physiol.* 305, 109-123, 1980.

37. Chiarandini, D.J., Brandt, P.W., Grunfest, H. Effects of caffeine on crayfish muscle I: Activation of contraction and induction of  $Ca^{++}$  Spike electrogenesis. Girardier, Katz, G. M., Grunfest H. Effects of crayfish muscle fibres II. Refractoriness and factors influencing recovery (repriming) of contractile responses. *J.Gen. Physiol.* 55, 640-687, 1970.
38. Chiasi M., M.M.H.G.Inesi, A.V. Somlyo, and A.P. Somlyo. Primary role of sarcoplasmic reticulum in phasic contractile activation of cardiac myocytes with shunted myolemma. *J. Cell. Biol.* 91, 728-742, 1981.
39. Chizzonite, R. A., and R. Zak. Calcium induced cell death: Susceptibility of cardiac myocytes in age-dependent. *Science.* 213, 1508-1511, 1981.
40. Davies, R.E. The role of ATP in muscle contraction. In: *Muscle*, edited by W.M. Paul, E.E. Daniel. C.M. Kay, and Monkton. New York: Pergamon, 1965, p.49-65.
41. Daitmer, J. W., and D. Ellis. Changes in the intracellular sodium activity of sheep heart Purkinj fibres produced by calcium and other divalent cations. *J.Physiol.* 277, 437-453, 1978.
42. Denton R.M., and J.G. Mc Cormack. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 119, 1-8, 1980.
43. Douglas C., and M.S. Brudwick. Effects of Barium on the Potassium conductance of squid axon. *J. Gen. Physiol.* vol. 75, 727-750, 1980.
44. Ebashi, S. A granule-bound relaxation factor in skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 76, 410-423, 1958.
45. Ebashi, S. Calcium binding and relaxation in the actomyosin. *J.Biochem.* 48, 150-151, 1960.
46. Ebashi S. Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* 50, 236-244, 1961.
47. Ebashi S., and F. Ebashi. Removal of calcium and relaxation in actomyosin systems. *Nature.* 194, 378-379, 1962.
48. Ebashi, S., and F. Kodama. Effects of alkaline earth metal on the contractile system with special reference to troponin. *Folia pharmac. jpn.* 63, 172, 1967.
49. Ebashi S., and F. Lipman. Adenosin triphosphate - linked concentration of calcium ion in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell. Biol.* 14, 389-400, 1962.

50. Ebashi S. and M. Endo. Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 18, 125-183, 1968.
51. Ebashi, S., M. Endo, and I. Ohnishi. Control of muscle contraction. *Quart. Rev. Biophys.* 2, 351-384, 1969.
52. Edman, K. A. P., D.W. and Grieve. On the role of calcium in the excitation - contraction process of frog sartorius muscle. *J. Physiol.* 170, 138-152, 1964.
53. Eisenberg, E., and L.E. Greene. The relation of muscle biochemistry to muscle physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 42, 293 - 309, 1980.
54. Endo M. Entry of a dye into the sarcotubular system of muscle. *Nature.* 202, 1115-1116, 1964.
55. Endo M. Calcium released from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 57, 71-108, 1977.
56. Endo M. Mechanism of calcium induced calcium release in the RS membrane. In: *The mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes.* edited by S.T. Ohnishi and Endo M. New York: Academic. 1981, p.257-264.
57. Endo M., and J.R. Blinks. Inconstant association of aequorin luminescence with tension during calcium released in skinned muscle fibres. *Nature New Biol.* 246, 218-221, 1973.
58. Endo M., M. Tanaka, and Y. Ogawa. Calcium induced released calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 228, 34-36, 1970.
59. Endo M., Y. Kakuta, and T. Kitasawa. A further study of the  $Ca^{++}$  induced  $Ca^{++}$  released mechanism. In: *The regulation of Muscle Contraction: Excitation-contraction Coupling.* edited by: A.D. Grinnel and M.A.B. Brazier. New York Academic, 1981, p.181-195.
60. Fabiato A. Mechanism of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cardiac cells studied with potential - sensitive dyes. In: *The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes.* edited by S.T. Ohnishi and M. Endo. New York: Academic. 1981, p 237-255
61. Fabiato A. Effects of cyclic AMP and phosphodiesterase inhibitors on the contractile activation and the  $Ca^{++}$  transient detected with aequorin in skinned cardiac cells from rat and rabbit ventricles. *J. Gen. Physiol.* 78, 15-16, 1981.

62. Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact isolated cardiac cell and during calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J.Gen.Physiol.* 78, 457-497, 1981
63. Fabiato A. Calcium release in skinned cardiac cell: variations with species tissues and development. *Fed. Proc.* 41: 2238-2244, 1982.
64. Fabiato, A. Calcium induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am.J.Physiol.* 245(cell. Physiol.14); C1-C14, 1983.
65. Fabiato, A. Effects of Ryanodine in skinned cardiac cells. *Fed. Proc.* 44, 2970-2976, 1985.
66. Fabiato A., and F.Fabiato. Effects of Magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells. *J.Physiol. Lon.* 249, 497-517, 1975a.
67. Fabiato A., and F.Fabiato. Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J.Physiol. Lond.* 249, 469-495, 1975b.
68. Fabiato A., and F.Fabiato. Calcium-induced release from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new born rat ventricles. *Ann. N.Y. Academic. Sci.* 307, 491-522, 1978a.
69. Fabiato, A., and F.Fabiato. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from cardiac and skeletal muscles. *J.Physiol. Lond.* 276, 233-255, 1978b.
70. Fabiato, A., and F.Fabiato. Use of chlorotetracycline fluorescence to demonstrate  $Ca^{++}$ -induced release of  $Ca^{++}$  from the sarcoplasmic reticulum of skinned muscle cells. *Nature Lond.* 281, 146-148, 1979a.
71. Fabiato A., and F.Fabiato. Calcium and cardiac excitation - contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 473-484, 1979b.
72. Farber, J.L. The role of calcium in cell death. *Life Sci.* 29, 1289-1295, 1981.
73. Fatt P. and B.L. Ginsborg. The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres. *J.Physiol. Lond.* 142, 516-543, 1958.

74. Fawcett, D.W., and Mc Nutt, M.S. The ultrastructure of the cat myocardium. *J.Cell. Biol.* 42, 1-45, 1969.
75. Fernandes, J., L.Rosenblatt, and C. Hidalgo. Highly purified sarcoplasmic reticulum vesicles are devoid of  $Ca^{++}$  - independent ("basal") ATPase activity. *Biochem. Biophys. Acta.* 599, 552-568, 1980.
76. Fiskum, G., and A.Lehninger. The mechanism and regulation of mitochondrial  $Ca^{++}$  transport. *Fed. Proc.* 39, 2432-2436, 1980.
77. Fiskum, G., and A.L.Lehninger. Mitochondrial regulation of intracellular calcium. In: *Calcium and Cell Function*, edited by W.Y. Cheung. New York: Academic 1982, vol.2, p.39-80.
78. Ford, L.E., R.J. Podolsky. Regenerative calcium released within muscle cells. *Science.* 167, 58-69, 1970.
79. Frank, G. B. Roles of extracellular and "trigger" calcium ions in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Can. J.Physiol. Pharmacol.* 60, 427-439, 1982.
80. Frank, G.B. Effects of changes in extracellular calcium concentration on the potassium induced contractures of frog's skeletal muscle. *J.Physiol.* 151, 518-538, 1960.
81. Franzini-Armstrong, C. Membrane particles and transmission at the triad. *Fed. Proc.* 34, 1382-1389, 1975.
82. Franzini-Armstrong, C., L.Landmesser, and G.Pilar. Size and shape of transverse tubule openings in frog twitch muscle fibres. *J.Cell.Biol.* 64, 493-497, 1975
83. Franzini-Armstrong, C. Structure of sarcoplasmic reticulum. *Fed. Proc.* 39, 2403-2409, 1980.
84. Fujino, M., T.Yamaguchi, and K.Suzaki. Glycerol effect and the mechanism linking excitation of the plasma membrane with contraction. *Nature.* 192, 1159-1161, 1961.
85. Gibbons, W.R., and H.A. Fozzard. High potassium and low sodium contractures in sheep cardiac muscle. *J.Gen.Physiol.* 58, 483-510, 1971.
86. Gibbons, W.R. and H.A. Fozzard. Relationships between voltage and tension in sheep cardiac Purkinje fibers. *J. Gen. Physiol.* 65, 345-365, 1975.
87. Gilkey, J.C., L.F. Jaffe, E.B. Ridway, and G.T. Reynolds. A free calcium wave transverse the activating egg of the Madaka *Oryzias latipes.* *J.Cell. Biol.* 76, 448-466, 1978.

88. Gilly, W.F. Intramembrane charge movement and excitation - contraction (E-C) coupling. In: The Regulation Muscle Contraction: Excitation - Contraction Coupling edited by A.D. Grinnel and M.A.B. Brazier. New York: Academic. 1981, p.3-22.
89. Glitsch, H.G., and L.Pott. Spontaneous tension oscillations in guinea pig atrial trabeculae. Pflüegers Arch. ges. Physiol. 358, 11-25, 1975.
90. Glitsch, H.H., H.Reuter, and H.Scholz. The effect of internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea pig auricles. J.Physiol. 209, 24-43, 1970.
91. Gonzalez-Serratos H. Inward spread of activation in twitch skeletal muscle fibers In: Handbook of Physiol. Skeletal Muscle edited by L.D. Peachey and R.H. Adrian Bethesda. M.D. Am.Physiol. Soc. 1983, sect.10 chapt.12, p.325-353.
92. Hagiwara, S. Membrane potential - Dependent Ion Channels in Cell Membrane. New York: Raven Press. 1983.
93. Hagiwara, S., J.Fukuda, and D.C. Eaton. Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. J.Gen.Physiol. 63, 564-578, 1974.
94. Hagiwara, S., and K. Maki. The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular Ca<sup>++</sup>. J.Gen.Physiol. 48, 140-162, 1964.
95. Hansen, T.R., D.K.Dinnen and R.Petrak. Mechanism of action of barium ion on rat aortic smooth muscle. Am. J.Physiol. 246(Cel. Physiol.15). C235-C241, 1984.
96. Hansford, R. G., and F. Castro. Effects of micromolar concentration of free calcium ions on the reduction of heart mitochondrial NAD(P) by 2-oxogentrate. Biochem.J. 198, 525-533, 1981.
97. Hasselgrove, J. X-ray evidence for conformational changes in the myosinfilaments of vertebrate striated muscle. J.Mol. Biol. 92, 113-143, 1975.
98. Hasselbach W. Relaxing factor and the relaxation of muscle. Prog. Biophys. Chem. 14, 1005-1017, 1977.
99. Hasselbach W. Calcium activated ATPase of the sarcoplasmic reticulum membranes In: Membrane Transport, edited by: S. L. Bonting and J. J. H. de Pont. Amsterdam: Elsevier' North Holland, 1981, p.183-208.

100. Hasselbach, W., and A. Weber. Der Einfluss des ME-Faktors auf die Kontraktion des Fasermollis. *Biochem. Biophys. Acta.* 11, 160-161, 1953.
101. Hasselbach, W., and M. Makinoze. Die calciumpumpe der "Erschlagungsgrüne" des muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* 333, 518-528, 1962.
102. Hailbrunn, L.V., and F.J. Wiercinski. The action of various cations on muscle protoplasm. *J.Cell. Comp. Physiol.* 29, 15-32, 1947.
103. Hermsmeyer, K., Sparclakis N. Decrease in K<sup>+</sup> conductance and depolarization of frog cardiac muscle produced by Ba<sup>++</sup>. *Am.J.Physiol.* 219, 1108-1114, 1970.
104. Hill, A.V. The abrupt transition from rest to activity in muscle. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* 136, 399, 1949.
105. Hirata, M., S. Suezatsu, T. Hashimoto, T. Hamashi, and T. Koga. Release of Ca<sup>++</sup> from a non-mitochondrial store site in peritoneal macrophages treated with saponin by inositol 1,4,5-triphosphate. *Biochem.J.* 223, 229-236, 1984.
106. Hitchcock, S., H.E. Huxley, and A.G. Szent-Gyorgi. Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin: a two sites model for troponin action. *J.Mol. Biol.* 60, 825-836, 1973.
107. Hodgkin, A.L., and A.F. Huxley. A quantitative description of membrane current and its application to conduction in nerve. *J. Physiol.* 117, 500-544, 1952.
108. Horowicz, F., and M.F. Schneider. Membrane charge movement in contracting and non contracting skeletal muscle fibres. *J.Physiol.Lond.* 314, 565-593, 1981.
109. Horowicz, F., M.F. Schneider. Membrane charge moved at contraction thresholds in skeletal muscle fibres. *J.Physiol.Lond.* 314, 595-633, 1981.
110. Howell, J.N. A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle. *J.Physiol.Lon.* 201, 515-533, 1969.
111. Hume, J.R., and W. Giles. Ionic currents in single isolated bullfrog atrial cells. *Gen. Physiol.* 81, 153-194, 1983.
112. Huxley, A.F., and J. Handson. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature, Lond.* 173, 973-976, 1954.

113. Huxley, A.F. Muscle structure and theories of contraction. Prog. Biophys. Chem. 7, 257-318, 1957.
114. Huxley, A.F., and E.E. Taylor. Local activation of striated muscle fibres. J.Physiol. Lond. 144, 426-441, 1958.
115. Huxley, A.F., and R.Niedergerke. Structural changes in muscle during contraction. Interference microscopy of living muscle fibres. Nature, Lond. 173, 971-973, 1954.
116. Huxley, H.E. Evidence for continuity between the central elements of the triads and extracellular space in frog sartorius muscle. Nature. 202, 1067-1071, 1964.
117. Huxley, H.E. The mechanism of muscular contraction. Science. 164, 1356-1366, 1969.
118. Huxley H.E. Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction. Cold Spring Harbor Sym. Quant.Biol. 37, 361-376, 1972.
119. Huxley, H.E. Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. In Structure and function of muscle, 2nd. ed., edited by G. H. Bourne. New York: Academic, 1973, vol.1, p.302-387.
120. Inesi, G., E.Maring, A.J. Murphy, and B.H. McFarland. A study of the phosphorylated intermediate of sarcoplasmic reticulum ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 136, 285-294, 1970.
121. Isenberg, G. Ca<sup>++</sup> entry and contraction as studied in isolated bovine ventricular myocytes. Z. Naturforsch. 37, 502-512, 1982.
122. Ikemoto, N. Structure and function of the calcium pump protein of sarcoplasmic reticulum. Ann. Rev. Physiol. 44, 297-317, 1982.
123. Joebis, F., and M.J. O'Connor. Calcium release and reabsorption in the sartorius of the toad. Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 246-252, 1966.
124. Jundt, H., H.Ports, H.Reuter, and J.W. Stuki. The effect of substances releasing intracellular calcium ions on sodium-dependant calcium efflux from guinea pig saricles. J.Physiol. 246, 229-253, 1975.
125. Jundt, H., and H.Reuter. Is sodium activated calcium efflux from mammalian heart dependent on metabolic energy". J.Physiol. 266, 78, 1974.

127. Kanada, T. and H.Kinoshita. Disturbances initiated from naked surface of protoplasm. Jap. J.Zool. 10, 469-493, 1943.
128. Karaki, H., M.Ikeda, and Urakawa. Effects of external calcium and some metabolic inhibitors on barium-induced tension changes in guinea pig taenia coli. Jap.J.Pharmac. 17, 603-612, 1967
129. Karaki, H., N.Satake and S.Shibata. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. Br. J.Pharmacol. 88, 821-826, 1985a.
130. Karaki, H., S.Shibata., and N.Satake. Mechanism of barium-induced contraction in vascular smooth muscle. Fed. Proc. 45, 671, 1986b.
131. Katsung, B.G., H.Rauter., and H.Forsig. Lanthanum inhibits  $Ca^{++}$  inward current but not Na-Ca exchange in cardiac muscle. Experientia. 29, 1073-1075, 1973.
132. Kielley, W.W., and O.Mayerhof. Studies on adenosine triphosphate of muscle. II A new magnesium - activated adenosinetriphosphatase. J.Biol. Chem. 176, 591-601, 1948.
133. Kielley W.W., and Mayerhof. Studies on adenosinetriphosphatase of muscle III. The Lipoprotein nature of the Magnesium-activated adenosinetriphosphatase. J.Biol.Chem.183, 391-401, 1950.
134. Kitasawa T. Physiological significance of  $Ca^{++}$  uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. J.Biochem. Tokio. 80, 129-1147, 1976.
135. Klienfeld Morris, M.D., Edward Stein, PhD. and Clem Tionaytis, E. Effects of barium on nature an embryonic heart cells. Circ. Res. Vol. XVIII, 484-491, 1966.
136. Knowles, A.F., and E. Racker. Properties of a reconstituted calcium pump. J.Biol.Chem. 250, 3538-3544, 1975.
137. Kohlhardt, M., B.Bauer, H.Krause, and A.Fleckenstein. Selective inhibition of the transmembrane  $Ca^{++}$  conductivity of mammalian myocardial fibres by Ni, Co, and Mn ions. Pfluegers Arch. 338, 115-125, 1973.
138. Kohlhardt, M., K.Haap, and H.R.Figulla. Influence of low extracellular pH upon the Ca inward current and isometric contractile force in mammalian ventricular myocardium. Pfluegers Arch. 366, 31-38, 1976.
139. Kohlhardt M., H.P.Haastert, and H.Krause. Evidence of non-specificity of the  $Ca^{++}$  channel in mammalian myocardial fibres Pfluegers Arch. 342, 125-135, 1973.

140. Kumagai, H., S. Ebashi, and F. Takada. Essential relaxing factor in muscle other than myokinase and creatine phosphokinase. *Nature*. 176, 166, 1955.
141. Kurachi, Y. The effect of intracellular protons on the electrical activity of single ventricular cells. *Pflügers Arch.* 394, 264-270, 1982.
142. Langer, G.A. Kinetics of calcium distribution in ventricular muscle of the dog. *Circ. Res.* 15, 393-405, 1964.
143. Langer, G.A. Heart: Excitation - contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 35, 53-86, 1973.
144. Langer, G.A., S. Frank, and A.J. Brady. The myocardium. In: *Cardiovascular Physiol.* II, edited by A.F. Guyton and A.W. Cowley. Baltimore, M.D: University Park 1976, vol.9, p.191-237, (Int. Rev. Physiol.Ser.).
145. Langer, G.A. Editorial. The role of calcium in the control of myocardial contractility: an update. *J.Mol.Cell.Cardiol.* 12, 231-239, 1980.
146. Lewartowski, B., B. Pytkowski, A. Prokopczuk, E. Wasilewska-Dziubinska, and W. Otwinowski. Amount and turnover of calcium entering the cell of ventricular myocardium of guinea pig heart in a single excitation. In: *Advances in Myocardiology*, edited by E. Chasov, V. Smirnov, and N.S. Dhalla. New York: Plenum, 1982, vol.3, p.345-357.
147. Lorkovic, E.H., A. Weber. The effect of replacement of calcium by strontium on excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle. *J.Physiol. Lond.* 186, 295-306, 1966.
148. Lowy, M., H.S. Slayter, A.G. Weeds and H. Baker. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation. *J. Mol.Biol.* 42, 1-29, 1969.
149. Lüttgau, H.C. and E. Niedergierke. The antagonism between  $Ca^{++}$  and  $Na^{+}$  ion on the frog's heart. *J.Physiol.* 143, 486-505, 1958.
150. Lüttgau, H.C. The action of calcium ions on potassium contractions of single muscle fibres. *J.Physiol.* 168, 679-697, 1963.
151. Lynn, R. W. Kinetic analysis of myosin and actomyosin ATPase. *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* 8, 145-163, 1979
152. Marsh, B.B. The effects of adenosine triphosphate on the fibre volume of a muscle homogenate. *Biochim. Biophys. Acta.* 9, 247-260, 1958.

152. Marsh. B.B. A factor modifying muscle fibre synaeresis. *Nature*. 167, 1065-1066, 1951.
154. Martonosi, A. Transport of calcium by sarcoplasmic reticulum In: *Calcium and Cell Function*, edited by W. Y. Cheung New York Academic, 1982, vol.3, p.37-102.
155. Martonosi, A. The regulation of cytoplasmic  $Ca^{++}$  in muscle and non-muscle cells In: *Muscle and non-muscle Motility*. edited by: A. Stracher New York: Academic, 1983, vol.1, p.233-358.
156. Martonosi, A. Mechanism of  $Ca^{++}$  release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Physiol. Rev.* Vol.64, No.4, 1240-1317, 1984.
157. Martonosi, A., and J.Bewler. Mechanism of  $Ca^{++}$  transport by sarcoplasmic reticulum In: *Handbook of Physiol. Skeletal muscle*, edited by L.D.Peachy and R.Adrian. Bethesda M.D. Am. Physiol. Soc. 1983, sect. 10, chapt.15, p.417-485.
158. Mascher D. Electrical and mechanical responses in ventricular muscle fibres during barium perfusion. *Pflügers Arch.* 342, 325-346, 1973.
159. Mascher D. el desarrollo de tensión en fibras musculares cardiacas expuestas al ión bario y a bajas temperaturas. XVII Congreso de Ciencias Fisiológicas pag. 117, Ixtapan de la Sal. 1974.
160. Mascher D., and Paper I. I. Two components of inward current in myocardial muscle fibres. *Pflugers Arch.* 307, 190-203, 1969.
161. Mathias, R.T., R.A.Lewis, and R.S.Eisenberg. Electrical models of excitation-contraction coupling and charge movement in skeletal muscle. *J.Gen. Physiol.* 76, 1-31, 1980.
162. Mathias, R.T., R.A.Lewis and R.S.Eisenberg. An alternative interpretation of charge movement in muscle. In: *The regulation of Muscle Contraction: Excitation-Contraction Coupling*, edited by A.D. Grinnel and M.A.B. Brazier. New York: Academic. 1981, p.39-51.
163. Mels, L. Mechanism and physiological significance of calcium transport across mammalian mitochondrial membranes. *Curr. Top. Membr. Transp.* 9, 321-366, 1977.
164. Menrard, D., G. Vassort, and R. Fischmeister. Changes in external Na induce a membrane current related to the Na-Ca exchange in Caesium-loaded frog heart cells. *J. Gen. Physiol.* 84, 201-220, 1984.

165. Miledi, R., I. Parker, and P. H. Zhu. Extracellular ions and excitation-contraction coupling in frog twitch muscle fibers. *J. Physiol. Lond.* 351, 687-710, 1984.
166. Mines, G. R. On .....analysis by the action of electrolytes. *J. Physiol.* 46, 188-235, 1913.
167. Miyamoto, H.  $Ca^{++}$  induced  $Ca^{++}$  release as a trigger mechanism of membrane potential dependent  $Ca^{++}$  release. In: *The Mechanism of Gated Calcium Transport Across Biological Membranes*, edited by S. T. Ohnishi and M. Endo. New York: Academic., 1981, p. 295-303.
168. Miyamoto H., and E. Racker. Mechanism of calcium release from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Membr. Biol.* 66, 193 - 201, 1982.
169. Morii H., and Tomomura. The gating behavior of a channel for  $Ca^{++}$  - induced  $Ca^{++}$  release in fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem. Tokyo.* 93, 1271-1285, 1983.
170. Muir, A. R. The effect of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart. *J. Anat.* 102, (2), 239-261, 1967.
171. Mullins, J., and A. S. Frumento. The concentration dependence of sodium efflux from muscle. *J. Gen. Physiol.* 46, 629-653, 1963.
172. Muscatello, V., E. Anderson-Adergren, and G. F. Azzona. The mechanism of muscle-fiber relaxation. Adenosine triphosphatase and relaxing activity of the sarco-tubular system. *Biochem. Biophys. Acta.* 63, 55-74, 1962.
173. Muscatello, U., E. Anderson-Cedergren, G. F. Azzona and A. Von der Decken. The sarco-tubular system of frog skeletal muscle. A morphological and biochemical study. *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.* 10, 201-218, 1961.
174. Nagasaki, K., and N. Kasai. Fast release of calcium from sarcoplasmic reticulum vesicles monitored by chlortetracycline fluorescence. *J. Biochem. Tokyo.* 94, 1101-1109, 1983.
175. Nagai, T., M. Mäkinen, and W. Hasselbach. Der physiologische Erschlaffungsfaktor und die Muskelgrana. *Biochem. Biophys. Acta.* 43, 223-238, 1960.
176. Nakamura, Y., and Y. Tomomura. Changes in affinity for calcium ion with the formation of two kinds of phosphoenzyme in the  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem. Tokyo.* 91, 449-461, 1982.

177. Natori, R. The role of myofibrils, sarcoplasm and sarcolemma in muscle contraction. *Jikeikai Med.J.* 1-18, 1954a.
178. Natori, R. The property and contraction process of isolated myofibrils. *Jikei-Kai Med.J.* 1, 119-126, 1954b.
179. New, W., and W. Trautwein. The ionic nature of slow inward current and its relation to contraction. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 334, 24-38, 1972.
180. Nicholls, D., and K. Akerman. Mitochondrial calcium transport. *Biochem. Biophys. Acta.* 683, 57-88, 1982.
181. Niedergerke, R. The potassium chloride contracture of the heart and its modification by calcium. *J. Physiol. Lond.* 134, 584-599, 1956.
182. Niedergerke, R. Movements of  $Ca^{++}$  in frog heart ventricles at rest during contractures. *J. Physiol.* 167, 515-550, 1963.
183. Noble, D. A modification of the Hodgkin-Huxley equations applicable to Purkinje fiber action and pacemaker potential. *J. Physiol. Lond.* 160, 317-352, 1962.
184. Noble, D., R.W. Tsien. Reconstruction of the repolarization process in cardiac Purkinje fibres based on voltage clamp measurements of membrane current. *J. Physiol. Lond.* 200, 233-254, 1969.
185. Noboru Toda, M.D. Barium-induced automaticity in relation to calcium ions and norepinephrine in the rabbit left atrium. *Circ. Res.* 27, 45-57, 1970.
186. Oetliker, H. An appraisal of the evidence for a sarcoplasmic reticulum membrane potential and its relation to calcium release in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 3, 247-272, 1982.
187. Ogawa, Y., and N. Kurebayashi. ATP-ADP exchange reaction fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Mot.* 3, 39-56, 1982.
188. Ogawa, Y., N. Kurebayashi, and H. Harafuji. Mechanism of  $Ca^{++}$  release from fragmented sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. In the mechanism of Gated Calcium Transport across Biological membranes, edited by S.T. Ohnishi and M. Endo. New York :Academic 1981, p. 265-273.
189. Ohnishi, S.T. Calcium induced calcium release as a gated calcium transport. In: The mechanism of Gated Calcium Transport across biological membrane. Edited by S.T. Ohnishi and M. Endo. New York :Academic, 1981 p. 275-293.

190. Ohnishi, S.T., and M.Endo (editors). The mechanism of Gated Calcium Transport across Biological membranes New York: Academic, 1981
191. Pappano, A.J. Calcium-dependent action potentials produced by catecholamines in guinea pig atrial muscle fibres depolarized by potassium. *Circ. Res.* 27, 379-390, 1970.
192. Pappano A.J., N.Sperelakis. Spike electrogenesis in cultured heart cells. *J.Physiol.* 217, 615-624, 1969.
193. Peachey, L.D. The sarcoplasmic reticulum and transverse tubules of the frog;s sartorius. *J.Cell. Biol.* 25: 209-231, 1965.
194. Peachey, L.D. and C.Franzini-Armstrong. Structure and function of membrane systems of skeletal muscle cells. In: Handbook of Physiology Skeletal muscle. Edited by L.D. Peachey and R.H. Adrian Bethesda, M.D. Am. Physiol. Soc. 1983 sect.10, chapt.2 p.23-71.
195. Peachey, L.D., and R.F. Schild. The distribution of the T. system along the sarcomeres of frog and toad sartorius muscles. *J.Physiol., Lond.* 194, 249-258 1968.
196. Philipson, K.D., and G.A. Langer. Sarcolemmal-bound calcium and contractility in the mammalian myocardium. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 11, 857-875 1979.
197. Podolsky, R.J., and L.L. Constantin. Regulation by calcium of the contraction and relaxation of muscle fibres. *Fed. Proc.* 23, 933-939, 1964.
198. Porter, K.R., and G.E. Palade. Studies on the endoplasmic reticulum III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J.Biophys, Biochem, Cytol.* 3, 264-299, 1957.
199. Porter, K.R. The sarcoplasmic reticulum. Its recent history and present status. *J.Biophys, Biochem, Aytol. Suppl.* 10, 219-226, 1961.
200. Potter, J.D., and J.Cegerly. The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J.Biol. Chem.* 250, 4628-4633, 1975.
201. Potreau D.,and G. Raymond. Slow inward Barium current and contraction on frog single muscle fibres. *J.Physiol.* 303, 91-109, 1980.
202. Raymond, G.,and D. Potreau. Barium ions and excitation - contraction coupling of frog single muscle fibres under controlled current and voltaje. *J.Physiol. Paris.* 73,

617-631, 1977 .

203. Reid, J.A.M.D., and H. Hecht, M.D. Barium induced automaticity in right ventricular muscle in the dog. *Circ. Res.* 21, 849-856, 1967.
204. Requena, H. Na-Ca counter transport in cardiac muscle. In: *Membranes and transport*, edited by A. Martonosi, New York: Plenum, 1979. vol.1 p.623-631.
205. Reuter, H. Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 26, 3-43, 1973.
206. Reuter H., Exchange of calcium ion in the mammalian myocardial. *Circ. Res.* 34, 599-605, 1974.
207. Reuter, H., H.Scholz. A study of selectivity and the kinetic properties of calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J.Physiol. Lond.* 264, 17-47, 1977.
208. Reuter H. and Seitz N. The dependence of Calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J.Physiol.* 195, 451-470, 1968.
209. Ridgway, E.B., and C.C.Ashley. Calcium transient in single muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 229-234, 1967.
210. Ringer, S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4, 29-42, 1883.
211. Rosenblatt, M., C.Hidalgo, C.Vergara., and N.Ikemoto. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J.Biol. Chem.* 256, 8140-8148, 1981.
212. Rougier, O., G. Vassort, Y. Cargouil, and E. Coraboeuf. Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential. *Pflügers Arch. Eur. J.Physiol.* 308, 91-110, 1969.
213. Saeki, Y., K.Sagawa, and H.Suga. Dynamic Stiffness of cat heart muscle in Ba<sup>++</sup> induced contracture. *Circ. Res.* vol.42, No.3, 324-333, 1978a.
214. Saeki, Y., K.Shiosawa, and K.Yanagisawa. Electrical phenomenon in rabbit papillary muscle during Ba<sup>++</sup> induced contracture. *Proc. Japan Acad.* 54, Ser.B., 565-568, 1978b.

215. Saeki, Y., K. Sagawa, and H. Suga. Transient tension responses of heart muscle in  $\text{Ba}^{++}$  contracture to step length changes. *Am. J. Physiol.* 238 (Heart Circ. Physiol. 7):H340-H347, 1980.
216. Saeki, Y., T. Shibata, and K. Shiozawa. Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac muscle during B
219. Schatzman, H.J. Active calcium transport in human red blood cells. In: *Membranes and Transport*, edited by A. Martonosi. New York. Plenum, 1982, vol.1, pp.601-605.
220. Schneider, M.F. Membrane charge movement and depolarization - contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 43, 507-517, 1981.
221. Schneider, M.F., and W.K.Chandler. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in
219. Schatzman, H.J. Active calcium transport in human red blood cells. In: *Membranes and Transport*, edited by A. Martonosi. New York. Plenum, 1982, vol.1, pp.601-605.
220. Schneider, M.F. Membrane charge movement and depolarization - contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 43, 507-517, 1981.
221. Schneider, M.F., and W.K.Chandler. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: a possible step in excitation contraction coupling. *Nature, Lond.* 242, 244-246, 1973.
222. Slavicek, J. Effect of  $\text{Ba}^{++}$  contractility of the isolated right rat ventricle. Substitution of NaCl for Choline or hypertonic sucrose. *Physiol. Bohemoslov.* 21, 189-199, 1972.
223. Solaro, J., and F.N.Briggs. Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle: calcium binding. *Circ. Res.* 34, 531-540, 1974a.
224. Solaro, R.J., W.M.Wise, J.S.Shiner, and F.N.Briggs. Calcium requirements for cardiac myofibrillar activation. *Circ. Res.* 34, 525-530, 1974b.
225. Somlyo, A.P., A.V.Somlyo, H.Gonzalez-Serratos, H.Shuman, and G. McClellan. The sarcoplasmic reticulum and its composition in resting and contracting muscle. In: *Muscle contraction: Its regulatory mechanisms*, edited by Ebashi, K. Maruyama, and m. Endo. Berlin Springer-Verlag, 1981a, p.421-433.
226. Somlyo, A.V., H.Gonzalez-Serratos, H.Shuman, G.McClellan, and A.P.Somlyo. Calcium release and ionic charges in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: An electron-probe study. *J.Cell. Biol.* 90, 577-594, 1981b.

227. Somlyo, A.V., A.P.Somlyo, H.Gonzalez-Serratos, H.Shuman, and Mc Clellan. Sarcoplasmic reticulum and mitochondria in excitation-contraction (E-C) coupling in smooth and striated muscle. In: The regulation of muscle contraction: Excitation-Contraction Coupling, edited by A.D. Grinnal and M.A.B. Brazier. N.Y.: Academic, 1981, p.199-214.
228. Sommer J.R., N.R. Wallace, and J.Junker. The intermediate cisternae of the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J.Ultrastruct. Res.* 71, 126-142, 1980.
229. Sommer J.R. The anatomy of the sarcoplasmic reticulum in vertebrate muscle: its implications for excitation-contraction coupling. *Z. Naturforsch. Teil.C.* 37, 665-678, 1982.
230. Sonnenblick, E.H. Active state in heart muscle: its delayed onset and modification by inotropic agents. *J.Gen. Physiol.* 50, 661-676, 1967.
231. Spiecker, W., W. Melzer, and H.C. Luttgau. Extracellular  $Ca^{++}$  and excitation contraction coupling. *Nature Lon.* 280, 158-160, 1979.
232. Squire J. The Structural Basis of Muscular Contraction. New York: Plenum. 1981.
233. Staley, N.A., and E.S.Benson. The ultrastructure of frog ventricular cardiac muscle and its relationship to mechanisms of excitation-contraction coupling. *J.Cell. Biol.* 38, 99-114, 1968.
234. Stefani, E., and D.J.Chiarandini. Skeletal muscle: Dependence of potassium contractures on extracellular calcium. *Pflügers Arch.* 343, 143-150, 1973.
235. Staiger, A.J., Brady, and S.T.Tan. Intrinsic regulatory properties of contractility in the myocardium. *Circ. Res.* 42, 339-350, 1978.
236. Stephen, V., and N. Sperelakis. Blockade of myocardial slow inward current at low pH. *Am.J.Physiol.* 233(3), C99-C103, 1977.
237. Stephenson, D.G., and R.Thieleczek. activation of the contractile apparatus of skinned fibres of frog by the divalent cations Barium, Cadmium and Nickel. *J.Physiol.* 380, 75-92, 1986.
238. Stephenson, E.W. Activation of fast skeletal muscle: contributions of studies on skinned muscle fibers. *Can. J.Physiol. Pharmacol.* 60, 415-426, 1982.

239. Stephenson, E.W., and R.J. Podolsky. Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 69, 1-16, 1977a.
240. Stephenson, E.W., and R.J. Podolsky. Influence of magnesium on chloride-induced calcium release in skinned muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* 69, 17-35, 1977b.
241. Suetatsu, E., M. Hirata, T. Hashimoto and H. Kuriyama. Inositol 1,4,5-triphosphate releases  $Ca^{++}$  from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 481-485, 1984.
242. Takisawa, H., and M. Makinose. Occlude bound calcium on the phosphorylated sarcoplasmic reticulum transport ATPase. *Nature Lon.* 290, 271-273, 1981.
243. Taylor, E.W., R.W. Lyman, and G. Moll. Myosin-product complex and its effect on the steady-state of nucleotide triphosphate hydrolysis. *Biochemistry* 9, 2984-2991, 1970.
244. Thieleczek, R. Electromechanical coupling III. Estimation of the  $Ca^{++}$  storage capacity of the S. R. by analysing the time course of caffeine induced tension transients of skinned muscle fibres. *Z. Naturforsch. teil C.* 37, 709-711, 1982.
245. Toda, N. Barium-induced automaticity in relation to calcium ions and noradrenaline in the rabbit left atrium. *Circ. Res.* 27, 45-57, 1970.
246. Toda, N. Effects of barium on membrane potentials of the sinoatrial node in response to sympathetic nerve stimulation. *Jap. J. Pharmac.* 21, 517-529, 1971.
247. Trautwein, W., T.F. Mc Donald, and O. Tripathi. Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. *Pflügers Arch.* 354, 55-74, 1975.
248. Vanderkooi, J.M., and A. Martonosi. Sarcoplasmic Reticulum. XII. Changes in the fluorescence of 8-anilino-1-naphthalene sulfonate during  $Ca^{++}$  transport. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 144, 99-106, 1971.
249. Van Eerd, J.P. and K. Takahashi. Determination of the complete amino acid sequence of bovine cardiac troponin C. *Biochem.* 15, 117-1180, 1976.
250. Vassort, G., and O. Rougier. Membrane potential and slow inward current dependence of frog cardiac mechanical activity. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 331, 191-203, 1972.

251. Volpe, P., G. Salviati, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. Inositol 1,4,5-triphosphate induce calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature*. 316, 347-349, 1985.
252. Vicenzi, F. P., and F. L. Larsen. The plasma membrane calcium pump: regulation by a soluble  $Ca^{++}$  binding protein. *Fed. Proc.* 39, 2427-2431, 1980.
253. Volpe, P., G. Salviati, F. Di Virgilio, and T. Pozzan. Inositol 1,4,5-triphosphate induce calcium release from sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *Nature*, 316, 347-349, 1985.
254. Wai Yiu Cheung. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Sci.* 207, 19-27, 1980.
255. Watanabe, S. Relaxing effects of EDTA on glycerol-treated muscle fibers. *Arch. Biochem. Biophys.* 54, 559-562, 1955.
256. Watanabe, S., Y. Tonomura, and H. Shiokawa. Mechanisms of muscular contraction. II. Kinetic studies on muscle ATPase. 40, 387-402, 1953.
257. Watanabe, S., and W. Sleator, Jr. EDTA relaxation of glycerol-treated muscle fibers and the effect of magnesium, Calcium, and Manganese ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 68, 81-101, 1957.
258. Weber A. On the role of calcium in the activity of adenosine 5 $\gamma$ -triphosphate hydrolysis by actomyosin. *J. Biol. Chem.* 234, 2764-2769, 1959.
259. Weber, A. The mechanism of action of caffeine on sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 52(5), 760-772, 1968.
260. Weber, A., and J. Murray. Molecular control mechanism in muscle contraction. *Physiol. Rev.* 53, 612-673, 1973.
261. Weber., and R. Herz. Requirement for calcium in the synaeresis of myofibrils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 6. 364-368, 1962.
262. Weber, A., and R. Herz. The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity. *J. Biol. Chem.* 238, 599-605, 1963.
263. Weber, A., R. Herz, and I. Raquas proponas. Role o-Armstrong, f calcium in contraction and relaxation of muscle. *Fed. Proc.* 23, 896-900, 1964.
264. Weber, A., and S. Winicur. The role of calcium in th, cipitation of actomyosin. *Jiol. Chem.* 236, 198-3202, 196, White, D. Rigor, concentration and the effect of various phosphate

compounds on glycerinate flight and vertebrate muscle.  
J.Physiol. Lond. 208, 583-605, 1970.

265. Winegrad, S. The location of muscle calcium with respect to the myofibrils. J.Gen. Physiol. 48, 997-1002, 1965.
266. Winegrad, S., Studies of cardiac muscle with a high permeability to calcium produced by treatment with ethylenediamine-tetracetic acid. J.H.E. Gen. Physiol. 58, 71-93, 1971.
267. Winegrad, S. Calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum. Ann. rev. Physiol. 44, 451-462, 1982.
268. Yamamoto, H., O.Hwang, and C.van Breemen. Bay K8644 differentiates between potential and receptor operated  $Ca^{++}$  channels. Eur. J.Pharmac. 102, 555-557, 1984.
269. Yamamoto, T., H.Takisawa, and Y.Tonomura. Mechanism for ATP hydrolysis and synthesis in the sarcoplasmic reticulum. Curr. Top. Bioenerg. 9, 179-236, 1979.
270. Yatani, A., Y.Imoto, and M.Goto. The effects of caffeine on the electrical properties of isolated, single rat ventricular cells. Jap. J.Physiol. 34, 337-349, 1984.
271. Yoshino, M., and H.Yabu. Single  $Ca^{++}$  channel currents in mammalian visceral smooth muscle cells. Pflügers Arch. 404, 285-286, 1985.
272. Yukishada, N., and F.Ebashi. Role of calcium in drug action on smooth muscle. Jap. J Pharmacol. 11, 46-53, 1961.