

CALIBRACIÓN *IN SITU* DEL INDICADOR FLUORESCENTE MAG-FLUO-4 EN
CÉLULAS MUSCULARES DE RATÓN

ANDRÉS FELIPE MILÁN TABARES
Grupo PHYSIS, Universidad de Antioquia

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito
para optar al título de

MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
ÉNFASIS BIOQUÍMICA

ASESOR

Juan Camilo Calderón Vélez. PhD
Departamento de Fisiología y Bioquímica, Universidad de Antioquia
Coordinador grupo PHYSIS, Universidad de Antioquia

COMITÉ TUTORIAL

Marco Antonio Giraldo Cadavid. PhD
Instituto de Física. Universidad de Antioquia
Grupo Biofísica y PHYSIS, Universidad de Antioquia

María Patricia Arias Gutiérrez. MSc. PhD
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad CES
Grupo PHYSIS, Universidad de Antioquia

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA Y BIOANÁLISIS
MEDELLÍN
JUNIO DE 2019

Calibración *in situ* del indicador fluorescente Mag-Fluo-4 en células musculares de ratón

Resumen

Introducción: El Ca^{2+} es un elemento clave en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción de las células musculares; su aparición y desaparición en el citoplasma se puede registrar utilizando indicadores fluorescentes como el Mag-Fluo-4. Los registros de la cinética del Ca^{2+} citoplasmático obtenidos con este indicador no se han presentado en términos de concentración de Ca^{2+} , pues no se conoce la F_{\min} , K_d y F_{\max} del indicador *in situ*, parámetros que permiten la calibración de la señal utilizando la ecuación propuesta por Grynkiewicz, Poenie & Tsien en 1985. **Objetivo:** Determinar *in situ* los parámetros que permitan calibrar las señales de fluorescencia obtenidas con Mag-Fluo-4 a valores de Ca^{2+} en células musculares. **Metodología:** Se obtuvieron células del músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) por disociación enzimática de 16 ratones C57BL/6J, se montaron en una cámara experimental con electrodos, sobre la platina de un microscopio invertido acoplado a una lámpara LED para la iluminación y a un juego de filtros, un fotomultiplicador y un digitalizador para registrar las señales. Para determinar la autofluorescencia se estimularon con luz LED células sin cargar con el indicador. Las células se cargaron con 6 μM de Mag-Fluo-4, AM por 10 min a temperatura ambiente y se registraron los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} , se permeabilizaron con Saponina (o con Ionomicina en un subgrupo de células) y se expusieron a Tyrode 0 mM de Ca^{2+} , solución calibradora de Ca^{2+} o Tyrode 100 mM de Ca^{2+} , todas sin Mg^{2+} , para determinar la F_{\min} , K_d o F_{\max} ,

respectivamente. Para hallar la compartimentalización del indicador se utilizó Tritón X-100. En todas las soluciones se utilizó 4-Metil-N-(fenilmetil) benzenosulfonamida (BTS) para inhibir la contracción muscular. A partir de estos valores se expresaron los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} en términos de la concentración de Ca^{2+} . **Resultados:** Se obtuvieron células alargadas, con patrón estriado, refringentes, que respondieron con acortamiento ante el estímulo eléctrico. Las células presentaron una autofluorescencia de $0,046 \pm 0,013$ U.A. ($n=6$). Determinamos *in situ* que el Mag-Fluo-4 tiene una $F_{\text{min}} \text{ corregida}$ ($n=10$) de $0,14 \pm 0,097$ U.A, una compartimentalización del $1,1 \pm 0,7$ % ($n=10$), una K_d de $118,9$ μM , una $F_{\text{máx}} \text{ corregida}$ de $150,889 \pm 8,798$ U.A. ($n=8$) al permeabilizar con Saponina y de $102 \pm 27,402$ U.A. ($n=9$) al permeabilizar con Ionomicina. La $F_{\text{máx}} \text{ corregida}$ para estos dos últimos compuestos fue significativamente diferente ($P < 0.05$). Para una señal promedio de 14 transitorios de fluorescencia, calculamos una concentración de Ca^{2+} libre basal en el citoplasma de $171 \pm 0,008$ nM y un pico en la concentración de Ca^{2+} libre tras el estímulo eléctrico de $17,37 \pm 4,1$ μM . La respuesta a BTS y la cinética de los transitorios sugiere que trabajamos exclusivamente con fibras tipo IIX. **Conclusiones:** Los parámetros para la calibración de un indicador fluorescente varían considerablemente según la metodología utilizada. Logramos determinar los parámetros *in situ* del Mag-Fluo-4 en células de FDB y expresar los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} en términos de concentración de Ca^{2+} . Nuestros hallazgos tienen aplicaciones para interpretar resultados futuros y ya publicados con este indicador en los cuales las señales se han reportado únicamente como cambios de fluorescencia.

Palabras claves: Ca^{2+} , Calibración *in situ*, Mag-Fluo-4, *flexor digitorum brevis*, microscopía de fluorescencia, músculo esquelético.

Lista de abreviaciones

ΔF : cambio de la fluorescencia con respecto a la fluorescencia basal

AEC: acoplamiento excitación-contracción

ATP: adenosín trifosfato

BTS: *4-Methyl-N-(phenylmethyl) benzenesulfonamide*

CaV1.1: canales de Ca^{2+} tipo L

CPA: ácido ciclopiazónico

DHPR: *dihydropyridine receptor*

DI: densidad integrada

DIC: densidad integrada corregida

EDL: *extensor digitorum longus*

F: fluorescencia experimental

$F_{\text{basal corregida}}$: fluorescencia basal corregida

F_{basal} : fluorescencia basal

FDB: *flexor digitorum brevis*

$F_{\text{máx corregida}}$: fluorescencia máxima corregida del indicador

$F_{\text{máx}}$: fluorescencia máxima del indicador

$F_{\min \text{ corregida}}$: fluorescencia mínima corregida del indicador

F_{\min} : fluorescencia mínima del indicador

I: indicador fluorescente

I_L : indicador libre

I_T : indicador total

K_d : constante de disociación

MCU: *mitochondrial Ca²⁺ uniporter*

NCX: *sodium-calcium exchanger*

PMCA: *plasma membrane Ca²⁺ ATPase*

R: ruido

RS: retículo sarcoplásmico

RyR: receptores de rianodina

SERCA: *sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*

SIU: sede de investigación universitaria

U.A.: unidades arbitrarias de fluorescencia

Introducción

Desde la segunda mitad del siglo XIX los músculos y las células musculares esqueléticas se han clasificado teniendo en cuenta propiedades fisiológicas como el color, en rojos y blancos; la velocidad de contracción y relajación, en rápidos o lentos; la fatigabilidad, etc. (Barnard *et al.* 1971; Burke *et al.* 1971; Close, 1972; Bottinelli & Reggiani, 2000).

En la década de 1960 surgió un esquema más complejo para la clasificación de las células musculares como resultado de la correlación de estudios de diferentes líneas de investigación: estudios bioquímicos, histoquímicos y fisiológicos de unidades motoras. La utilización de técnicas de microscopía electrónica, la medición de la actividad de enzimas como la succinato deshidrogenasa (SDH), la glicerofosfato deshidrogenasa (α -GPD) y la ATPasa de miosina (Dubowitz & Pearse, 1960; Engel, 1962; Stein & Padykula, 1962; Guth & Samaha, 1969; Brooke & Kaiser, 1970; Peter *et al.* 1972), dieron como resultado la clasificación de los tipos de fibras en tipo I (anteriormente llamados rojos o lentos) y en tipo IIA y IIB (anteriormente llamados blancos o rápidos).

Posteriormente se clasificó un tercer tipo de fibra rápida con la identificación de una cadena pesada de miosina (MHC) diferente a la IIA y IIB, llamada por algunos IID (Bar & Pette, 1988; Termin, Staron & Pette *et al.* 1989) y por otros IIX (Schiaffino *et al.* 1988; 1989). También se determinó que existen fibras intermedias (conocidas como híbridas), las cuales contienen al menos dos tipos de miosinas (Staron & Pette, 1993; Bottinelli & Reggiani, 2000).

Muchas de las propiedades de los tipos de fibras afectan o se ven afectadas por la diferencia en la cinética de la señalización del Ca^{2+} y la maquinaria molecular involucrada en el fenómeno de acoplamiento excitación-contracción (AEC) (Baylor & Hollingworth 2003; Calderón *et al.* 2009).

El AEC en el músculo esquelético representa una comunicación rápida entre los eventos eléctricos que ocurren en la membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (RS), lo cual lleva a la contracción muscular (Sandow, 1952; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014).

La secuencia de eventos del AEC en el músculo esquelético inicia con un potencial de acción que se propaga longitudinalmente a lo largo de la célula y transversalmente a través de los túbulos T. Estos cambios en el potencial de membrana son detectados por los canales de Ca^{2+} tipo L (CaV1.1) (Ziman *et al.* 2010) o receptores de dihidropiridinas (DHPR, *Dihydropyridine receptor*) (Lamb, 1992), proteínas que en el músculo esquelético funcionan básicamente como sensores de voltaje ubicados en los túbulos T. Los DHPR transmiten la señal a los receptores de rianodina (RyR) presentes en el RS (Stephenson, Lamb & Stephenson, 1998; Fill & Copello, 2002; Protasi, 2002) ocasionando un cambio conformacional en los RyR y la liberación de Ca^{2+} desde el RS hacia el citoplasma (Caputo, Bolaños & González, 2004; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014).

Los RyR son canales de Ca^{2+} regulados por adenosín trifosfato (ATP), el ion Mg^{2+} , el mismo ion Ca^{2+} , el estado de óxido-reducción, el estado de fosforilación/desfosforilación y por otras proteínas (Lai, *et al.* 1988; Fill & Copello,

2002; Wei *et al.* 2006; Bleunven *et al.* 2008; Prosser *et al.* 2008; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014).

El aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y su interacción con la troponina C suspende la inhibición que la troponina I y la tropomiosina ejercen sobre la interacción actina-miosina, lo que permite el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos y genera la tensión (Ebashi, 1974). La subsecuente activación del sistema amortiguador de Ca^{2+} y del aparato contráctil termina con la disminución y rápida recaptura del Ca^{2+} citoplasmático.

El Ca^{2+} basal en el citoplasma tiene una concentración aproximadamente de 100 nM y en el espacio extracelular de 2 mM (Bers, 2018). El sistema es capaz de mantener este gradiente transportando Ca^{2+} al exterior de la célula a través del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (NCX, *Sodium-calcium exchanger*) (Hidalgo, Cifuentes & Donoso, 1991) y la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA, *Plasma membrane Ca^{2+} ATPase*) (Cully *et al.* 2016).

En el citoplasma el Ca^{2+} es capturado por la proteína amortiguadora de Ca^{2+} parvalbúmina (Schwaller, 2012). La bomba de Ca^{2+} del RS (SERCA, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase*) regresa el Ca^{2+} al RS (Toyoshima & Mizutani, 2004). Las mitocondrias capturan el Ca^{2+} rápidamente a través de la proteína transmembrana uniporter de Ca^{2+} mitocondrial (MCU, *Mitochondrial calcium uniporter*) (Barrige, Bootman & Roderick, 2003). Todos estos mecanismos

aseguran la relajación del músculo esquelético y le permite estar listo para responder ante un nuevo estímulo.

La participación del Ca^{2+} en procesos fisiológicos ha impulsado el desarrollo de metodologías para su detección intracelular en células vivas (Hu, Yu & Yu, 2005). La salida y remoción del Ca^{2+} en el citoplasma puede documentarse por microscopía de fluorescencia cuantitativa mediante la obtención de señales de intensidad lumínica en función del tiempo, que son conocidas como transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} . Estas señales son la respuesta de moléculas denominadas indicadores fluorescentes de Ca^{2+} .

Las primeras mediciones confiables de Ca^{2+} intracelular fueron realizadas por Ridgway & Ashley en 1967 inyectando la fotoproteína aequorina en células musculares de *Balanus nubilus*. Posteriormente, a principios de la década de 1980 Tsien y sus colaboradores desarrollaron varios indicadores fluorescentes (Grynkiewicz, Poenie & Tsien, 1985), lo cual impulsó las investigaciones de los fenómenos intracelulares relacionados con Ca^{2+} (Hu, Yu & Yu, 2005).

Para estudiar los cambios de Ca^{2+} intracelular durante la contracción en músculo esquelético se han utilizado diferentes indicadores fluorescentes de Ca^{2+} (Tabla 1) como Fura-2 (Westerblad & Allen, 1991; Hu, Yu & Yu, 2005; Darbellay *et al.* 2011, Cully *et al.* 2012), Mag-Fura-2 (Konishi *et al.* 1991; Delbono & Stefani, 1993; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009), Indo-1 (Jacquemond, 1997; Andrade, Reid & Westerblad, 2001; Hu, Yu & Yu, 2005; Zhou *et al.* 2006; Prosser *et al.* 2008; Kerr *et al.* 2013; López *et al.* 2015), Mag-Fura-5 (Delbono & Stefani, 1993; Szentesi *et al.* 1997), Fluo-3 (Caputo & Bolaños, 1994; Calderón, Bolaños & Caputo, 2011),

Fluo-4 (Prosser *et al.* 2008, Ríos *et al.* 2008; Ackermann *et al.* 2011; Kerr *et al.* 2013), Rhod-5N (Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Cully *et al.* 2016), Fluo-5N (Ziman *et al.* 2010; Cully, Edwards & Launikonis, 2014) o Mag-Fluo-4 (Caputo, Bolaños & González, 2004; Capote *et al.* 2005; Calderón *et al.* 2009; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; Baylor & Hollingworth, 2011; Calderón, Bolaños & Caputo, 2011; Wei-LaPierre *et al.* 2013; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014; López *et al.* 2015).

Los indicadores fluorescentes tienen diferentes propiedades (Tabla 1), en general, pueden dividirse según sean relacionométricos o no-relacionométricos (Kao, Li & Auston, 2010). Los no-relacionométricos, como el Mag-Fluo-4, pueden excitarse con luz visible y se caracterizan porque al unirse al Ca^{2+} la longitud de onda a la cual presentan la máxima excitación o emisión no cambia; cuando se unen a Ca^{2+} estos indicadores presentan cambios solamente en la intensidad de fluorescencia.

Dentro de los no-relacionométricos hay varias moléculas que tienen afinidades por el Ca^{2+} en el orden micromolar, lo cual permite su uso para estudiar Ca^{2+} dentro de células musculares (Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014). En este grupo el Mag-Fluo-4 exhibe ventajas dado su cinética rápida, una constante de disociación (K_d) *in vitro* de 22 μM , un espectro de

Tabla 1. Propiedades *in vitro* de algunos indicadores fluorescentes de Ca²⁺ utilizados en músculo esquelético.

Indicador	Afinidad por el Ca ²⁺ *	K _d para Ca ²⁺ /Mg ²⁺ (μM)*	Excitación-Emisión (nm)*	Relacionométrico	Ejemplos de uso en investigaciones
Fluo-3	Alta	0,325/0	506-526	No	Caputo & Bolaños, 1994; Calderón, Bolaños & Caputo, 2011.
Fluo-4	Alta	0,345/0	494-516	No	Prosser <i>et al.</i> 2008, Ríos <i>et al.</i> 2008; Ackermann <i>et al.</i> 2011; Kerr <i>et al.</i> 2013.
Fluo-5N	Baja	90/0	494-516	No	Ziman <i>et al.</i> 2010; Cully, Edwards & Launikonis, 2014.
Fura-2	Alta	0,14/0	336/366-500	Sí	Westerblad & Allen, 1991; Hu, Yu & Yu, 2005; Darbellay <i>et al.</i> 2011, Cully <i>et al.</i> 2012.
Indo-1	Alta	0,23/0	345-480/415	Sí	Jacquemond, 1997; Andrade, Reid & Westerblad, 2001; Hu, Yu & Yu, 2005; Zhou <i>et al.</i> 2006; Prosser <i>et al.</i> 2008; Kerr <i>et al.</i> 2013; López <i>et al.</i> 2015.
Mag-Fluo-4	Baja	22/4700	490-517	No	Caputo, Bolaños & González, 2004; Capote <i>et al.</i> 2005; Calderón <i>et al.</i> 2009; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2011; 2014; Baylor & Hollingworth, 2011; Wei-LaPierre <i>et al.</i> 2013; López <i>et al.</i> 2015.
Mag-Fura-2	Baja	25/1900	369/329-511	Sí	Konishi <i>et al.</i> 1991; Delbono & Stefani, 1993; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009.
Rhod-5N	Baja	320/0	551-576	No	Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Cully <i>et al.</i> 2016.

* Datos reportados por el fabricante Thermo Fisher Scientific

excitación con luz visible, una eficiencia cuántica relativamente alta, mayor que el Oregon Green Bapta 5N (OGB-5N), Fura-5N, Rhod-5N y menor que el Rhod-2 y el Fluo-3 (Caputo, Bolaños & González, 2004; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2011; 2014). La principal desventaja de los indicadores no relacionométricos radica en que al registrar la señal de fluorescencia a una sola longitud de onda los cambios en la señal derivados de factores no relacionados con Ca^{2+} , como una alteración en el tamaño de la célula o fuga de indicador, puede alterar la interpretación de los datos (Kao, Li & Auston, 2010).

Los indicadores relacionométricos, por otro lado, no sólo muestran un cambio en la intensidad, sino también en la longitud de onda en la cual se dan los máximos de excitación o emisión. Los compuestos relacionométricos tienen algunas desventajas, el Fura-2, por ejemplo, requieren excitación con dos longitudes de onda en el rango ultravioleta, lo cual hace que la instrumentación sea bastante compleja. Otra desventaja es que muchas preparaciones biológicas son autofluorescentes y esto puede generar artefactos en las señales. Su ventaja radica en el hecho de que la señal definitiva de Ca^{2+} deriva de la relación entre las señales de fluorescencia generadas para las formas del indicador libre de Ca^{2+} y unido a Ca^{2+} , y eso minimiza algunos artefactos que no están relacionados con la concentración de Ca^{2+} (Kao, Li & Auston, 2010).

Los indicadores fluorescentes de Ca^{2+} se han utilizado ampliamente para estudiar el AEC en el músculo esquelético de mamíferos, en particular de roedores (Baylor & Hollingworth, 2011). Desafortunadamente, los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático reportadas en respuesta a un potencial de acción en un

mismo tipo de célula varían mucho de un estudio a otro. Esto puede deberse a la elección del indicador fluorescente (Calderón, Bolaños & Caputo, 2014).

En las células musculares los cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático provocados por un potencial de acción son grandes y breves, por lo tanto, para lograr una estimación precisa de la amplitud y el curso en el tiempo del cambio de las concentraciones de Ca^{2+} se debe emplear un indicador de respuesta rápida y baja afinidad por el Ca^{2+} (Hirota *et al.*, 1989; Konishi, Suda & Kurihara, 1993). Un indicador de Ca^{2+} se puede considerar de baja afinidad cuando tiene una K_d para el $\text{Ca}^{2+} > 25 \mu\text{M}$ (Baylor & Hollingworth, 2011).

Compuestos como el Fura-2 o el Indo-1, al tener una alta afinidad por el Ca^{2+} (K_d en el orden nM) y una baja tasa de separación del Ca^{2+} presentan limitaciones para seguir en forma confiable la cinética rápida de los movimientos de Ca^{2+} dentro de la célula muscular durante la contracción (Delbono & Stefani, 1993; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009). Algunos compuestos como el Mag-Fura-2 y el Mag-Fluo-4 tienen menores afinidades por el Ca^{2+} (K_d en el orden μM) y generan señales mucho más rápidas; sin embargo, el Mag-Fura-2 es técnicamente más difícil de usar y tiene una menor eficiencia cuántica cuando se une al Ca^{2+} en comparación con el Mag-Fluo-4 (Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014). Por estas razones, varios grupos, incluido el nuestro, han propuesto que el Mag-Fluo-4 es un buen indicador para estudiar la cinética del Ca^{2+} dentro de las células musculares (Fig. 1) (Capote *et al.* 2005; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2011; 2014).

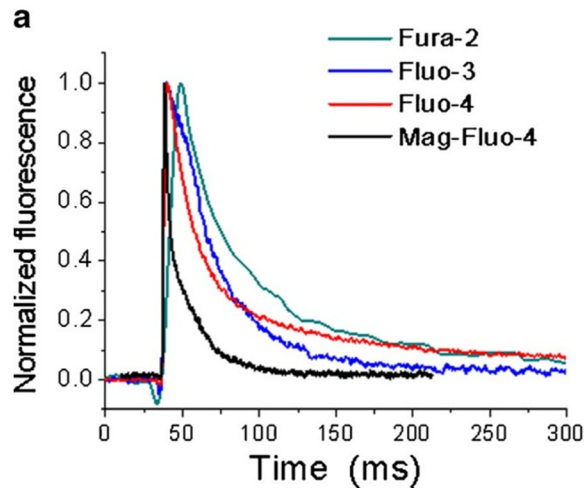


Figura 1. Comparación de la cinética de transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de una sacudida simple obtenidos en varias células musculares de ratón adulto cargadas con diferentes indicadores fluorescentes (Fura-2, Fluo-3, Fluo-4, Mag-Fluo-4). El más rápido y que mejor sigue la cinética del Ca^{2+} intracelular es el Mag-Fluo-4 y el que peor lo hace es el Fura-2. (Tomada de Calderón, Bolaños & Caputo, 2014, Fig 1.)

Durante los últimos años, se ha empleado Mag-Fluo-4 para estudiar el Ca^{2+} citoplasmático muscular bajo diferentes condiciones experimentales en células del músculo *flexor digitorum brevis* (FDB) (Caputo, Bolaños & González, 2004; Capote *et al.* 2005; Calderón *et al.* 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2011; Wei-LaPierre *et al.* 2013; Calderón, Bolaños & Caputo, 2014; López *et al.* 2015). Con este compuesto y utilizando células musculares aisladas de ratón, se demostraron los cambios que presentan los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} durante el desarrollo muscular (Capote *et al.* 2005), las diferencias cinéticas entre tipos de fibras (Calderón *et al.* 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2014) y las modificaciones que sufren durante la fatiga (Calderón, Bolaños & Caputo, 2011). Además, se demostró que los mecanismos de liberación y recaptura de Ca^{2+} tienen un papel diferente en cada tipo de fibra (Calderón, Bolaños & Caputo, 2010b; 2014). Sin embargo, en los trabajos anteriormente mencionados las

señales obtenidas, que reflejan Ca^{2+} , se han mostrado como relaciones entre la fluorescencia basal (F_{basal}) y la fluorescencia pico alcanzada durante la estimulación de las células y no como concentraciones de Ca^{2+} .

Las señales de Ca^{2+} provenientes de indicadores no-relacionados como el Mag-Fluo-4 se pueden calibrar y expresar en términos de concentraciones de Ca^{2+} empleando la ecuación propuesta originalmente por Grynkiewicz, Poenie & Tsien en 1985:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{(F - F_{\text{min}})}{(F_{\text{máx}} - F)} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde se tiene en cuenta la K_d del indicador por el Ca^{2+} y los valores de Ca^{2+} medidos experimentalmente a partir de las señales de fluorescencia: fluorescencia experimental (F), fluorescencia mínima del indicador (F_{min}) y fluorescencia máxima del indicador ($F_{\text{máx}}$).

La k_d de los indicadores fluorescentes reportada por los fabricantes se determina generalmente *in vitro* en ausencia de Mg^{2+} , en solución salina entre 0,1-0,2 M, a una temperatura entre 16-22 °C y a un pH de ~7 (Baylor & Hollingworth, 2011). Pero esta determinación no tiene en cuenta otros elementos presentes en citoplasma que pueden alterar la afinidad del indicador por el Ca^{2+} como: la fuerza iónica, el efecto del pH, la viscosidad, la presencia de lípidos y proteínas intracelulares. Utilizar parámetros determinados *in vitro* en la calibración de señales de Ca^{2+} puede ocasionar estimaciones inexactas, probablemente

subestimando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Petr & Wurster, 1997). Para el Mag-Fluo-4 no se ha determinado *in situ* la K_d , la F_{\min} y la F_{\max} .

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo es determinar *in situ* los parámetros que permitan calibrar las señales de fluorescencia obtenidas con Mag-Fluo-4 a valores de Ca^{2+} intracelular en músculo FDB, para finalmente expresar las señales de fluorescencia de los registros de transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} como concentraciones de Ca^{2+} .

La estimación *in situ* de los parámetros mencionados anteriormente del Mag-Fluo-4 posibilitará que señales obtenidas en términos de cambios de fluorescencia se conviertan a concentraciones de Ca^{2+} intracelular, lo que permitirá dar respuesta a algunas preguntas importantes en el área que permanecen sin respuesta, como: ¿cuál es la diferencia de la liberación de Ca^{2+} que hay entre los tipos de fibras?, ¿cuáles son los cambios cuantitativos que hay cuando las fibras se fatigan?, ¿cómo podemos cuantificar el efecto de algunos potenciadores sobre la liberación de Ca^{2+} dentro de las células? (Calderón, Bolaños & Caputo, 2014).

Materiales y métodos

Animales y aspectos éticos

Se emplearon un total de 16 ratones (14 machos y 2 hembras) adultos de la cepa C57BL/6J, con una edad de 72 ± 13 días y un peso de $24,2 \pm 2,9$ g. Los animales tuvieron ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas con libre acceso a agua y comida en las instalaciones del bioterio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU)-Universidad de Antioquia. Los procedimientos realizados en ratones en el

desarrollo de este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia.

Soluciones y reactivos

Para la disección, disociación enzimática y lavados se utilizó Tyrode 2 mM de Ca^{2+} : 140 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM Glucosa, 10 mM Hepes, 0,33 mM NaH_2PO_4 , pH 7,3.

Para la disociación enzimática se utilizó solución de disociación 1 mM de Ca^{2+} : 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0,5 mM MgCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 0,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,3 y Colagenasa tipo 2 (LS004176 lote F7S17990B, Worthington).

En los ensayos de fluorescencia se utilizó 6 μM de Mag-Fluo-4, AM (M14206 lote 10811211, Thermo Fisher Scientific) a partir de un stock a 4 mM de Mag-Fluo-4, AM diluido en DMSO (D231 lote 0495B49, AMRESCO).

Durante los ensayos de F_{\min} , F_{\max} y K_d *in situ* se inhibió la contracción muscular con 50 μM de 4-Metil-N-(Fenilmetil) benzenosulfonamida (BTS) (1870 lote 1A/211388, TOCRIS), un inhibidor selectivo de la actividad ATPasa de la miosina II del músculo esquelético (Cheung *et al.* 2002), a partir de un stock de 5 mM diluido en DMSO. Se permeabilizó la membrana celular con Saponina al 0,002 % (47036 lote BCBS6399V, Sigma-Aldrich) a partir de un stock de Saponina al 0,1 % diluido en agua destilada o con 40 μM de Ionomicina (I9657 lote 18M4020V, Sigma-Aldrich) a partir de un stock de 5 mM diluido en DMSO y se permeabilizaron membranas subcelulares con Tritón X-100 al 1 % (M143 lote 2062C017, AMRESCO) diluido en agua destilada. Se usó 15 μM de Ácido ciclopiazónico

(CPA) (1235/10 lote 8B/213070, TOCRIS) a partir de un stock de 5 mM diluido en DMSO, para inhibir la SERCA (Ljubojevic *et al.* 2011) e interrumpir el transporte de Ca^{2+} al RS.

Para la calibración *in situ* se utilizaron soluciones con concentraciones de Ca^{2+} libre de 100 nM, 1 μM , 4 μM , 40 μM y 100 μM adquiridas del kit CALBUF-2 (lote 6J, WPI, USA). En el desarrollo de los experimentos se prepararon soluciones de Tyrode con concentraciones conocidas de Ca^{2+} libre de 0 mM, 1 mM, 10 mM, 50 mM y 100 mM sin Mg^{2+} , siguiendo el procedimiento descrito por Bers, Patton & Nuccitelli en 2010 utilizando el programa MaxChelator (<http://maxchelator.stanford.edu/>) (Tabla 2) y agua ultrapura tipo I (Direct-Q 3, Merck).

Tabla 2. Composición de las soluciones con concentraciones conocidas de Ca^{2+} libre utilizando el programa MaxChelator.

Nombre de la solución	[EGTA] (mM)	[Ca^{2+}] total (mM)	[Ca^{2+}] libre (mM)	pH
Tyrode 0 mM de Ca^{2+} libre [‡]	10	0,1*	$9,696^{-10}$	7,3
Tyrode 1 mM de Ca^{2+} libre [†]	10	10,99	1	7,3
Tyrode 10 mM de Ca^{2+} libre [†]	10	20	10	7,3
Tyrode 50 mM de Ca^{2+} libre [‡]	10	60,01	50	7,3
Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre [‡]	10	110,01	100	7,3

[‡] Solución utilizada para hallar la F_{\min} y compartimentalización del indicador. [†]Solución utilizada para establecer la K_d . [‡]Solución utilizada para determinar la F_{\max} . *Concentración aproximada de Ca^{2+} en el agua ultrapura estimada al comparar la señal de fluorescencia emitida por el Mag-Fluo-4 en el agua ultrapura con los valores de la curva de calibración.

Procedimientos experimentales

Disociación enzimática

Para la separación de las células se empleó el método de disociación enzimática descrito por Bekoff & Betz en 1977, modificado por Capote *et al.* en 2005 y Calderón *et al.* en 2009. El músculo entero se incubó en solución de disociación con 3 mg/mL de Colagenasa tipo 2 a 37 °C por 82 min, después de este procedimiento el músculo se lavó tres veces con solución de Tyrode 2 mM de Ca²⁺ y se resuspendió en 3 mL de la misma solución. Finalmente, se separaron las células musculares de los tendones y restos de tejido conectivo aspirando y soltando suavemente el músculo 45 veces con ayuda de pipetas Pasteur de vidrio pulidas al fuego con diferentes diámetros.

La determinación de la obtención de células vivas se realizó mediante la evaluación de la viabilidad celular por medio de tres técnicas: i) Visualización de las características morfológicas por microscopía, ii) Contracción frente a estímulos eléctricos de 20 voltios con duración de 1 ms y una frecuencia de 0,25 Hz utilizando un estimulador eléctrico GRASS instruments S6, y iii) Registro de transitorios de fluorescencia de Ca²⁺.

La suspensión de células se almacenó a 4 °C y los experimentos se llevaron a cabo en las 18 primeras horas después de la muerte del animal, durante este tiempo las células permanecían excitables y se contraían fuertemente (Calderón, Bolaños & Caputo, 2011).

Visualización por microscopía y adquisición de las señales de fluorescencia

Las imágenes de microscopía en campo claro y fluorescencia se obtuvieron por medio de un microscopio invertido (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Alemania), usando una cámara digital (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss, Alemania). La adquisición de las señales de fluorescencia se realizó iluminando las células con una lámpara de Mercurio (HXP 120V, Carl Zeiss, Alemania) o un bombillo LED, la longitud de onda para estimular el Mag-Fluo-4 se seleccionó empleando un juego de filtros (09 488009-9901, Carl Zeiss, Alemania) para excitar el indicador entre 450 y 490 nm y recoger la emisión superior a 515 nm. Las señales luminosas provenientes de las células se colectaron con un fotomultiplicador (Fotómetro PTI D-104 y fotomultiplicador 710, Horiba, Japón). La salida del fotomultiplicador se llevó a un convertidor analógico-digital (Digidata 1550A, Molecular Devices, USA). Todo el sistema se controló a través del software pCLAMP 10.0.5 (Molecular Devices, USA). La amplitud de las señales de fluorescencia (ΔF) crudas se reportaron como el cambio de la fluorescencia sobre la fluorescencia basal (F_{basal}) en unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.).

Carga de las células con el indicador fluorescente de Ca^{2+} , determinación de la fluorescencia basal (F_{basal}) y autofluorescencia

Los experimentos se realizaron sembrando la solución de células disociadas en una cámara de perfusión (RC-27NE2, Warner Instruments, USA). Para el montaje se añadió etanol al 70 % a una placa cubreobjetos de 24x50 mm y se limpió con una servilleta de papel realizando fricción, evaporando el alcohol y generando una

atracción electrostática que permitió la adherencia de las células a la placa. Se agregó vaselina a la cámara de perfusión en los 4 extremos de la cara inferior y se unió dicha cara con la placa cubreobjetos; esto se hizo para que las dos superficies quedaran bien unidas y no se presentaran fugas de la solución. Se acopló la cámara de perfusión en la plataforma (PH 6, Warner Instruments, USA) y se adicionó 400 μL de la solución de células disociadas. La preparación completa se montó sobre la platina del microscopio invertido.

En cada uno de los experimentos se observó el montaje en campo claro por microscopia y se escogió una célula morfológicamente intacta y que presentara contracción fuerte frente a estímulos eléctricos.

Las células se cargaron utilizando una concentración final de Mag-Fluo-4, AM de 6 μM en Tyrode 2 mM de Ca^{2+} . El indicador se dejó actuar por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para los experimentos de $F_{\text{máx}}$ se lavaron las células 10 veces retirando por un extremo de la cámara experimental 250 μL de la solución y adicionando 250 μL de Tyrode 2 mM de Ca^{2+} por otro extremo. En los experimentos de F_{min} y determinación de la K_d los lavados se realizaron con Tyrode 0,1 mM de Ca^{2+} . Después se dejó el montaje en reposo por 10 min para que el indicador se terminara de desesterificar y se estabilizara la F_{basal} , se escogió una región rectangular de interés de la célula de aproximadamente $55 \times 15 \mu\text{m}^2$, siendo el eje mayor del rectángulo perpendicular al eje longitudinal de la célula.

Se visualizó la fluorescencia por medio del fotomultiplicador acoplado a un puerto lateral del microscopio, la señal de fluorescencia de esta región era de

aproximadamente 10 U.A. en una escala de 0 a 200 U.A. La señal de fluorescencia obtenida corresponde a la emitida por el Ca^{2+} basal (F_{basal}). Se agregó 50 μM de BTS y se verificó la inhibición de la contracción frente al estímulo eléctrico para continuar los experimentos. Este es el punto de partida para la medición de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} , compartimentalización del indicador, determinación de la K_d , la F_{min} y la $F_{\text{máx}}$. (Fig. 2).

Para determinar la autofluorescencia de las células se escogió una región de interés de aproximadamente $55 \times 15 \mu\text{m}^2$ en células sin cargar con el indicador fluorescente, se estimuló la célula con la lámpara de fluorescencia y se registró con el fotomultiplicador la señal de fluorescencia. Los valores de la K_d , la F_{min} y la $F_{\text{máx}}$ obtenidos se corrigieron restando este valor.

Medición de transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} .

Las células musculares vivas tienen la propiedad de cambiar la concentración citoplasmática de Ca^{2+} libre luego de diversos estímulos, generando señales que se pueden documentar en función del tiempo; el registro que se genera se conoce como transitorio de fluorescencia de Ca^{2+} (Calderón & Figueroa, 2009). Para obtener los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} , una vez visualizada la F_{basal} , la célula se estimuló eléctricamente con 20 voltios, 1 ms de duración y una frecuencia de 0,25 Hz a través de electrodos que corren paralelamente a lo largo de la cámara de perfusión y se registró el curso temporal de la señal de fluorescencia con el fotomultiplicador.

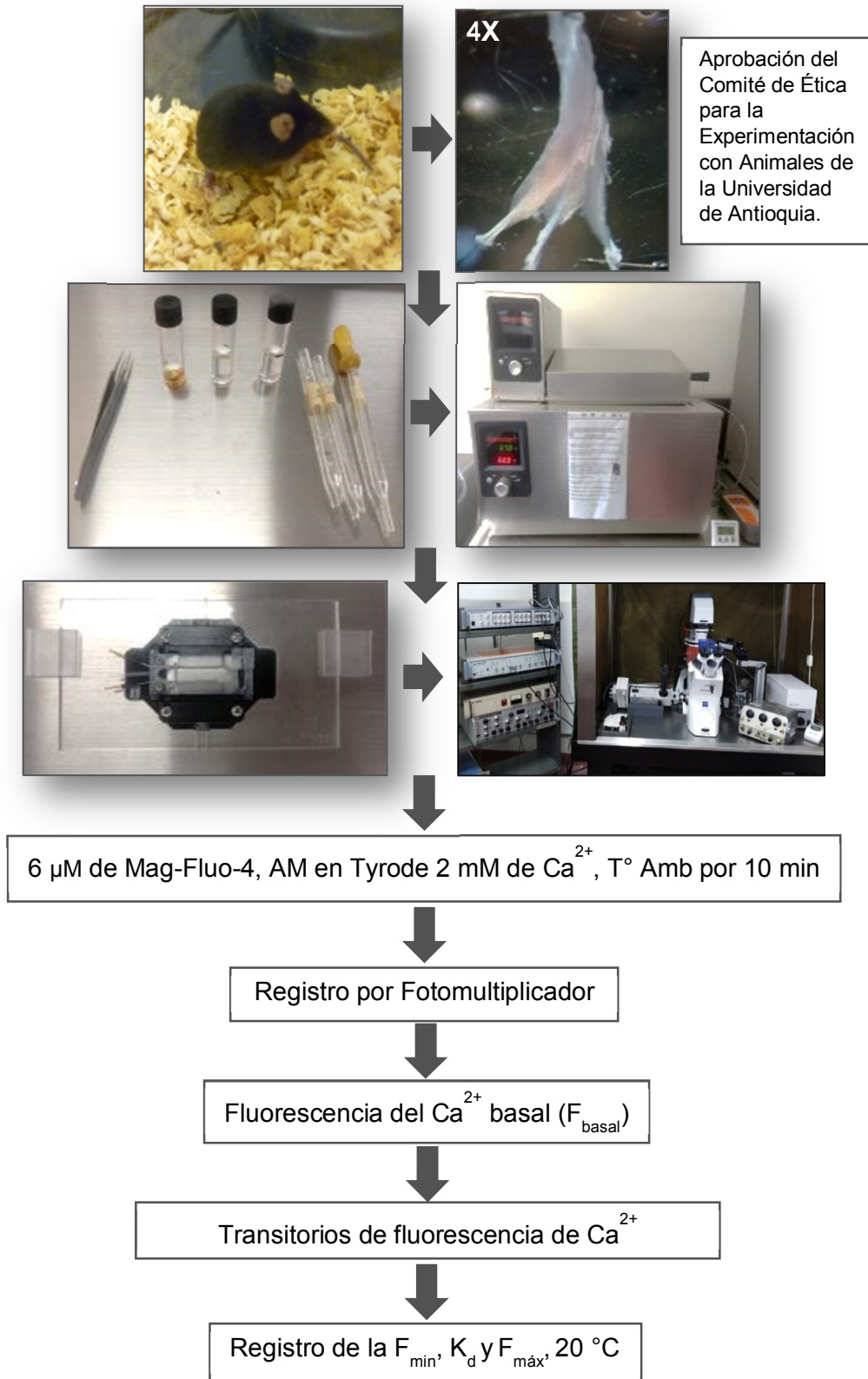


Figura 2. Diseño experimental

Utilizamos el software Clampfit 10.5.0.9 (Molecular Devices, USA) para determinar los parámetros cinéticos de los transitorios de Ca^{2+} . Para cada registro tomamos la F_{basal} como línea de base, seleccionamos un transitorio representativo y por medio de la herramienta estadística hallamos la amplitud del pico (ΔF), tiempo de ascenso, el ancho medio y el tiempo de decaimiento. Posteriormente realizamos un ajuste con una función exponencial doble de la forma:

$$y=A_1 \cdot e^{-\frac{(x-x_0)}{t_1}}+A_2 \cdot e^{-\frac{(x-x_0)}{t_2}}+C$$

Donde y representa el valor de la fluorescencia, x el tiempo, y t_1 y t_2 las constantes de tiempo de caída (ms) de la fase rápida (A1) y de la fase lenta (A2), respectivamente. Las amplitudes de estas fases A1 y A2 se reportan en porcentajes, asumiendo que ΔF representa el 100% de la señal.

Determinación de la F_{min} y compartimentalización del indicador

Una vez registrados los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} el montaje se llevó a una temperatura de 20 °C y las células se lavaron 10 veces retirando por un extremo de la cámara experimental 200 μL de la solución y adicionando por el otro 200 μL solución de Tyrode 0 mM de Ca^{2+} libre, finalizando con una solución Tyrode 0 mM de Ca^{2+} libre con Saponina al 0,002 %, 15 μM de CPA y 50 μM de BTS. Se registró el cambio en la intensidad de la señal de fluorescencia en el tiempo con el fotomultiplicador. La mínima señal adquirida correspondió a la F_{min} .

Para verificar si hubo compartimentalización del indicador, una vez obtenida la F_{min} se agregó Tritón X-100 al 1 % para permeabilizar membranas intracelulares y liberar el indicador que se compartimentalizó, se registró con el fotomultiplicador el

cambio en la señal de fluorescencia en el tiempo. El porcentaje de compartimentalización del indicador se obtuvo multiplicando por 100 la señal obtenida después del estímulo con Tritón X-100 al 1 %, dividido por la señal de la fluorescencia basal corregida.

Determinación de la K_d

Los valores para determinar la K_d se obtuvieron al adquirir por medio del fotomultiplicador la máxima señal de fluorescencia del indicador en presencia de soluciones con concentraciones de Ca^{2+} libre conocidas a una temperatura de 20 °C. Una vez se obtuvieron los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} se cambiaron los 400 μL de solución de la cámara de perfusión con Tyrode 0,1 mM de Ca^{2+} por la solución calibradora realizando 8 lavados, retirando por un extremo de la cámara experimental 200 μL de la solución y adicionando por el otro 200 μL de la solución calibradora de Ca^{2+} . Al final de este recambio, se adicionaron 15 μM de CPA y 50 μM de BTS disueltos en 200 μL de la solución calibradora y se dejó en reposo por 10 min. Después se agregó a la cámara de perfusión 200 μL de la solución calibradora de Ca^{2+} con Saponina al 0,002 %, 15 μM de CPA y 50 μM de BTS, se registró el cambio de la señal de la fluorescencia en el tiempo por medio del fotomultiplicador.

La señal de fluorescencia del indicador correspondiente a la concentración de Ca^{2+} libre conocida se estableció como el pico máximo de la señal menos la autofluorescencia. Se graficaron los valores máximos de las señales de fluorescencia corregidos por la autofluorescencia en función del pCa^{2+} de las

diferentes soluciones calibradoras, incluyendo los resultados de la F_{\min} y la F_{\max} , se hizo un ajuste de Boltzmann y a partir del parámetro x_0 se calculó la K_d (Fig. 7B).

Determinación de la F_{\max}

La F_{\max} del indicador se obtuvo adicionando 50 μM de BTS en solución de Tyrode 2 mM de Ca^{2+} a las células cargadas con el indicador, a una temperatura de 20 °C. Se dejó en reposo por 10 min y se agregó solución de Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre con Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS o Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre, 40 μM de Ionomicina y 50 μM de BTS. Se registró la señal de fluorescencia obtenida por el fotomultiplicador. El punto máximo de la señal de fluorescencia después del estímulo menos la autofluorescencia se consideró como la F_{\max} corregida del indicador.

Se realizó un ensayo previo para asegurar que la señal de fluorescencia obtenida correspondía a la señal del indicador en condiciones saturantes de Ca^{2+} , adicionando a las células cargadas con el indicador Tyrode 50 mM de Ca^{2+} libre o Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre con Saponina al 0,002 %. En este ensayo se utilizaron los dos niveles mínimos de excitación de la lámpara de fluorescencia (Nivel 1 y Nivel 2) para determinar si la intensidad de la lámpara tiene algún efecto sobre la adquisición de las señales. Las señales se registraron mediante imágenes tomadas con una cámara acoplada al microscopio de fluorescencia.

Mediante el software ImageJ 1.51j8 (Instituto Nacional de Salud, USA), separamos las imágenes fotográficas en RGB, seleccionamos en el canal verde un área de $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ de la célula y otra área del fondo con la misma medida y

determinamos utilizando la herramienta Analizar - medida, los valores promedios de la densidad integrada (DI) de la célula y del ruido de fondo (R) en unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.i), con estos valores hallamos la densidad integrada corregida (DIC) de las células mediante la ecuación:

$$DIC = DI - (\text{Área} \times R)$$

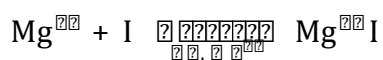
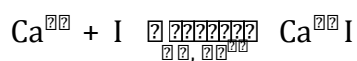
Ecuación 2

Para verificar el cambio que sufrió la célula en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} se analizó la longitud de la célula antes y después del estímulo de $F_{m\acute{a}x}$ mediante imágenes en campo claro utilizando el software ImageJ 1.51j8.

Calibración de los transitorios de fluorescencia en términos de concentración de Ca^{2+}

Para expresar los transitorios de fluorescencia en términos de concentración de Ca^{2+} reemplazamos en la ecuación de Grynkiewicz, Poenie & Tsien (ecuación 1) el valor de la fluorescencia obtenida en U.A. y los valores determinados experimentalmente de la F_{min} , la $F_{m\acute{a}x}$ y la K_d . corregidos por la autofluorescencia.

Realizamos un análisis matemático para determinar en los registros de la F_{basal} qué porcentaje de la amplitud corresponde al indicador unido al Ca^{2+} y al Mg^{2+} . Las reacciones del indicador Mag-Fluo-4 con el Ca^{2+} y con el Mg^{2+} son descritas como las siguientes reacciones reversibles:



donde I representa el indicador fluorescente y K_d, Ca^{2+} y K_d, Mg^{2+} son las constantes de disociación de Ca^{2+} y de Mg^{2+} respectivamente. Por la definición de la constante de disociación tenemos que:

$$K_d, Ca^{2+} = \frac{[Ca^{2+}][I]}{[Ca^{2+}I]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$K_d, Mg^{2+} = \frac{[Mg^{2+}][I]}{[Mg^{2+}I]} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde $[Ca^{2+}I]$ y $[Mg^{2+}I]$ son las concentraciones de Ca^{2+} y de Mg^{2+} unidas al indicador en estado de equilibrio, y $[I_L]$ es la concentración del indicador libre, también en estado de equilibrio. Además, definimos $[I_T]$ como la concentración total de indicador, que puede estar unido al Ca^{2+} , unido al Mg^{2+} y libre,

$$[I_T] = [I_L] + [Ca^{2+}I] + [Mg^{2+}I] \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Al despejar $[I_L]$, $[Ca^{2+}I]$ + $[Mg^{2+}I]$ del sistema de ecuaciones 3.1, 3.2 y 3.3, obtenemos que:

$$[I_L] = \frac{[I_T] (1 + \frac{[Ca^{2+}]}{K_d, Ca^{2+}} + \frac{[Mg^{2+}]}{K_d, Mg^{2+}})}{\frac{[Ca^{2+}]}{K_d, Ca^{2+}} + \frac{[Mg^{2+}]}{K_d, Mg^{2+}} + 1} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

$$[Ca^{2+}I] = \frac{[Ca^{2+}][I_T]}{\frac{[Ca^{2+}]}{K_d, Ca^{2+}} + \frac{[Mg^{2+}]}{K_d, Mg^{2+}} + 1} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

y

$$[Mg^{2+}I] = \frac{[Mg^{2+}][I_T]}{\frac{[Ca^{2+}]}{K_d, Ca^{2+}} + \frac{[Mg^{2+}]}{K_d, Mg^{2+}} + 1} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Obtención de los datos y estadística

Los registros de fluorescencia obtenidos con el fotomultiplicador se analizaron con el programa Clampfit 10.5.0.9 (Molecular Devices, USA). En general, a todos se les aplicó un filtro de paso bajo tipo gaussiano de 1000 Hz. Posteriormente se corrigió el registro restando la amplitud promedio calculada en una región de 1,5 s obtenida con la luz LED apagada. La F_{basal} se calculó en una región de 5 s obtenida después de hacer incidir la luz sobre la célula. Para los diferentes experimentos (F_{min} , $F_{\text{máx}}$ y K_d) el valor de la máxima amplitud se obtuvo al promediar una región de 0,5 s justo en el pico del registro. El abordaje de promediar regiones al analizar un registro es más preciso que tomar un valor puntual, porque reduce el impacto de las oscilaciones en el ruido sobre el valor medido.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPadPrism 6.01 (GraphPad, USA) y Origin Pro 2015 (OriginLab, USA), los valores se muestran como $\text{media} \pm \text{DE}$. Para establecer diferencias entre dos conjuntos de datos empleamos la prueba t de Student y más de dos conjuntos de datos empleamos la prueba ANOVA con prueba post-hoc de Tukey. Se consideraron significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados

Obtención de las células musculares y evaluación de la viabilidad celular

Logramos realizar la disección del músculo FDB entero, sin tejidos de músculos adyacentes y sin daños mecánicos en un tiempo post-sacrificio del ratón de 9 ± 3 min y 18 ± 5 min, para los músculos de las extremidades posteriores 1 y 2, respectivamente, obteniendo una buena cantidad de células vivas en suspensión que preservaron las características morfológicas del tejido (Fig. 3).

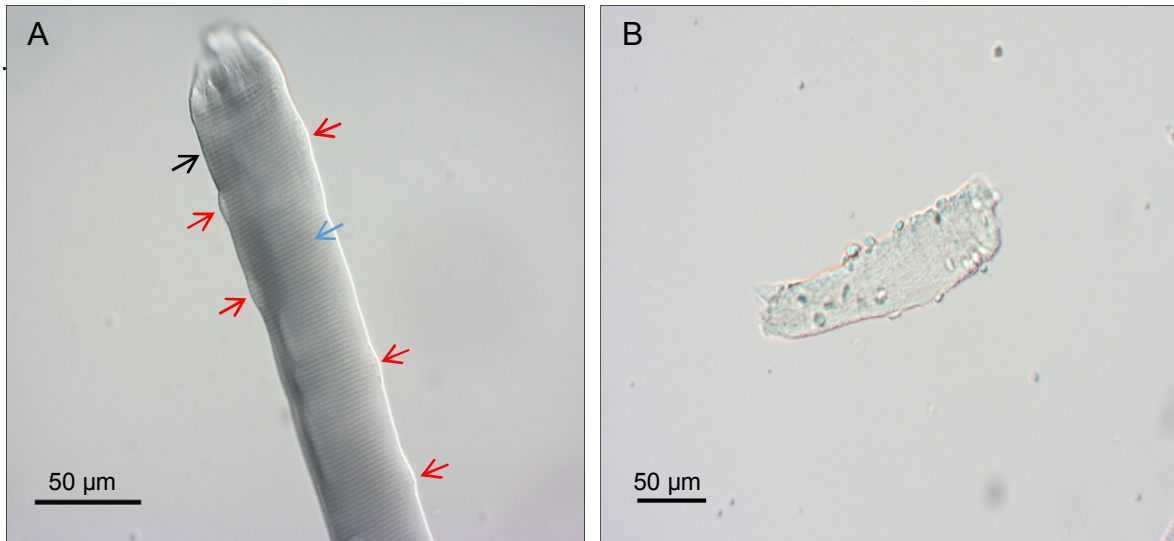


Figura 3. Características morfológicas de viabilidad celular. (A) Célula en Contraste de Interferencia Diferencial viva, completa, alargada, con membrana definida (flecha negra) con estriaciones transversales producto de la organización de los filamentos delgados y gruesos (flecha azul) y múltiples núcleos periféricos (flechas rojas). **(B)** Célula en campo claro muerta o deteriorada con obvias alteraciones estructurales.

Las células de interés sometidas a estimulación eléctrica conservaron la capacidad de contraerse fuertemente (resultados no mostrados) y posterior a la

carga con el indicador Mag-Fluo-4, AM generaron transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} (ver adelante). Estos resultados en conjunto demuestran la viabilidad de las células musculares obtenidas en la suspensión

Carga de las células con el indicador fluorescente de Ca^{2+} , determinación de la F_{basal} y autofluorescencia

Las células no cargadas con el indicador Mag-Fluo-4, AM al ser excitadas emitieron una fluorescencia verde tenue, lo que facilitó la ubicación de la región de interés. El valor de la fluorescencia registrado en la región de interés por el fotomultiplicador correspondiente a la autofluorescencia fue de $0,046 \pm 0,013$ U.A. ($n=6$).

Las células cargadas con $6 \mu\text{M}$ Mag-Fluo-4, AM por 10 min exhibieron buen ingreso y una distribución uniforme del indicador en su citoplasma. Al visualizar las células en campo claro después de la carga se observaba cómo el citoplasma se tornaba naranja (color del indicador) (Fig. 4B) y al excitar las células se apreciaba la emisión en verde solo en el interior de las células (Fig. 4C). La F_{basal} de las células utilizadas en todos los experimentos realizados fue de $9,986 \pm 0,421$ U.A y la F_{basal} corregida fue de $9,940 \pm 0,421$ U.A. ($n=63$).

Medición de transitorios de fluorescencia de Ca^{2+}

En la evaluación de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} se determinaron los cambios en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático mediante el registro de la señal de fluorescencia emitida por el indicador Mag-Fluo-4 en el tiempo, como respuesta al estímulo eléctrico. Las células no perdieron adherencia por la

contracción generada frente el estímulo eléctrico, ni durante los lavados de los diferentes experimentos.

Se determinaron los parámetros cinéticos de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} obtenidos ($n=14$) (Fig. 5) a partir de una $F_{\text{basal corregida}}$ de $10,387 \pm 0,487$ U.A.

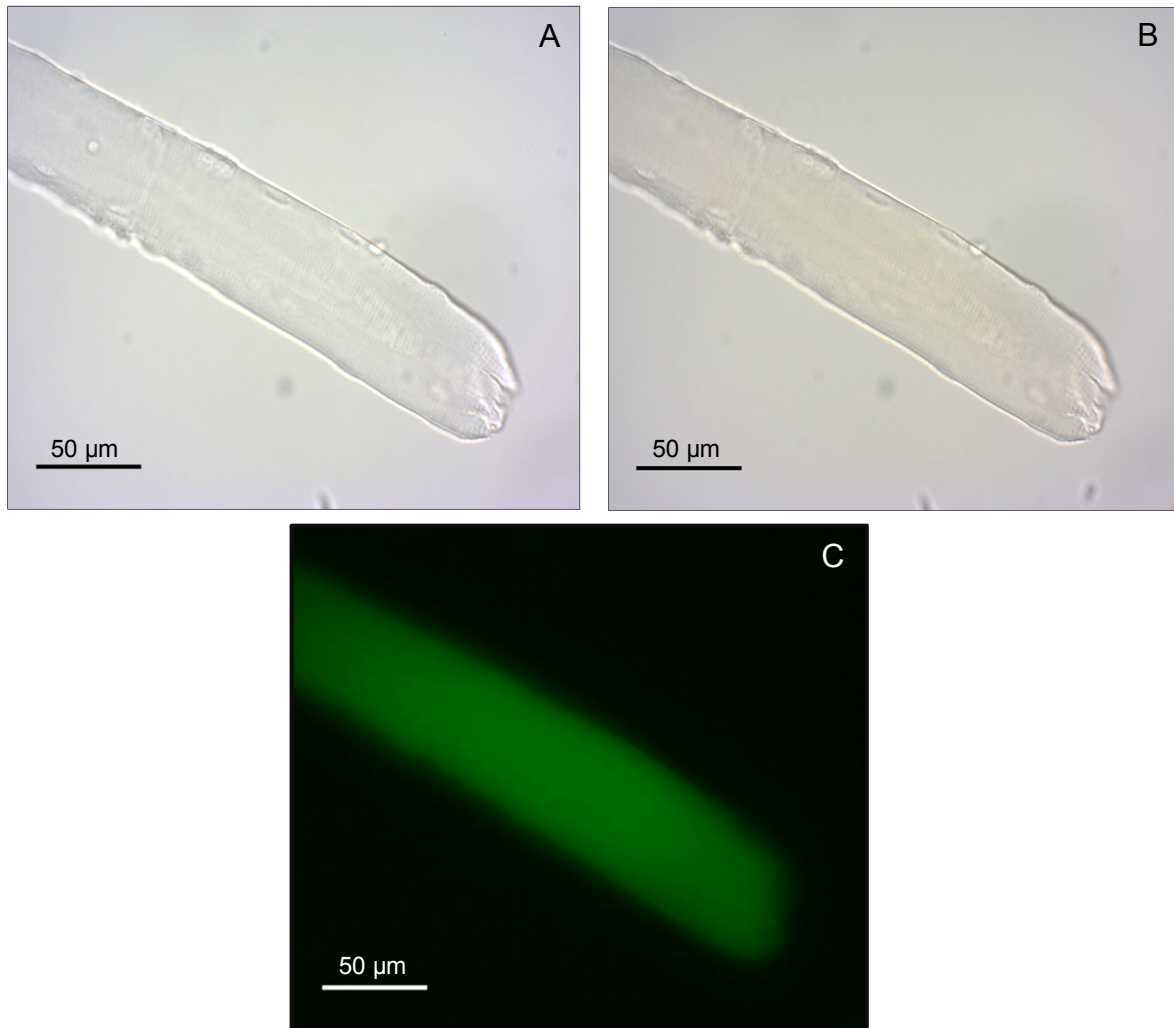


Figura 4. Carga de las células con 6 µM del indicador fluorescente Mag-Fluo-4, AM. (A) Célula en campo claro antes de la carga con el indicador. (B) Célula en campo claro después de la carga con el indicador. (C) Fluorescencia del indicador correspondiente al Ca^{2+} basal.

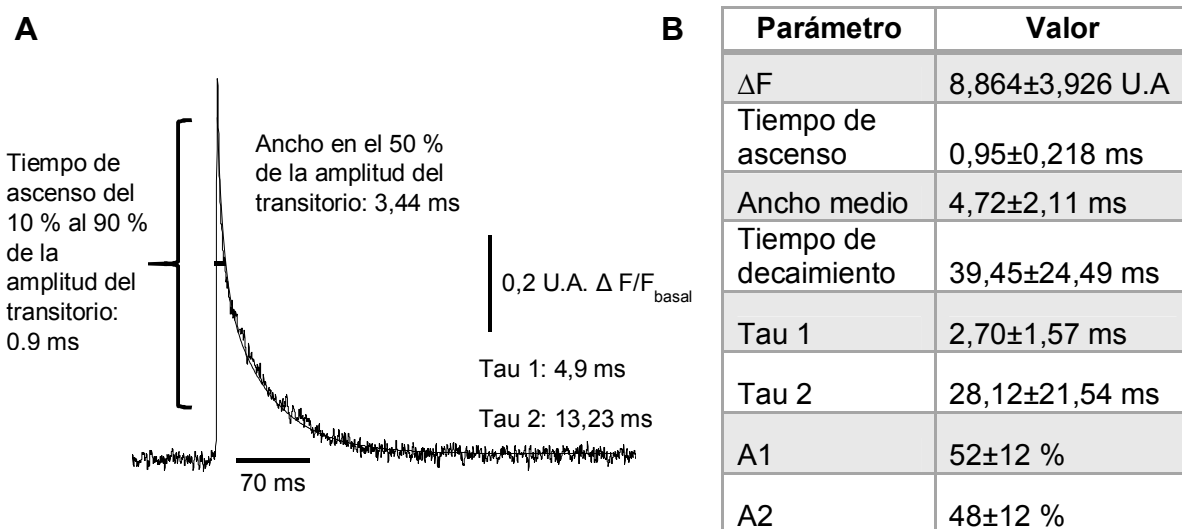


Figura 5. Morfología y parámetros cinéticos de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de músculo FDB de ratón. (A) Transitorio de fluorescencia de Ca^{2+} de una sacudida simple con los valores de los parámetros cinéticos característicos del transitorio de fluorescencia. **(B)** Promedio de los parámetros cinéticos de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} ($n=14$). Los valores se muestran como media±DE.

Determinación de la F_{\min} y compartimentalización del indicador

En los experimentos para determinar la F_{\min} y compartimentalización del indicador ($n=10$) se partió de una $F_{\text{basal corregida}}$ de $10,15 \pm 0,58$ U.A. Al adicionar el estímulo de Tyrode 0 mM de Ca^{2+} libre + Saponina al 0,002 % la intensidad de la señal de fluorescencia decayó, estabilizándose posteriormente, tomamos estos valores y los corregimos por la autofluorescencia, dando como resultado una $F_{\min \text{ corregida}}$ de $0,14 \pm 0,1$ U.A. Al agregar posteriormente Tritón X-100 al 1 %, la señal decayó nuevamente estabilizándose en $0,11 \pm 0,07$ U.A., lo que representa una compartimentalización del $1,1 \pm 0,7$ % del Mag-Fluo-4 (Fig. 6).

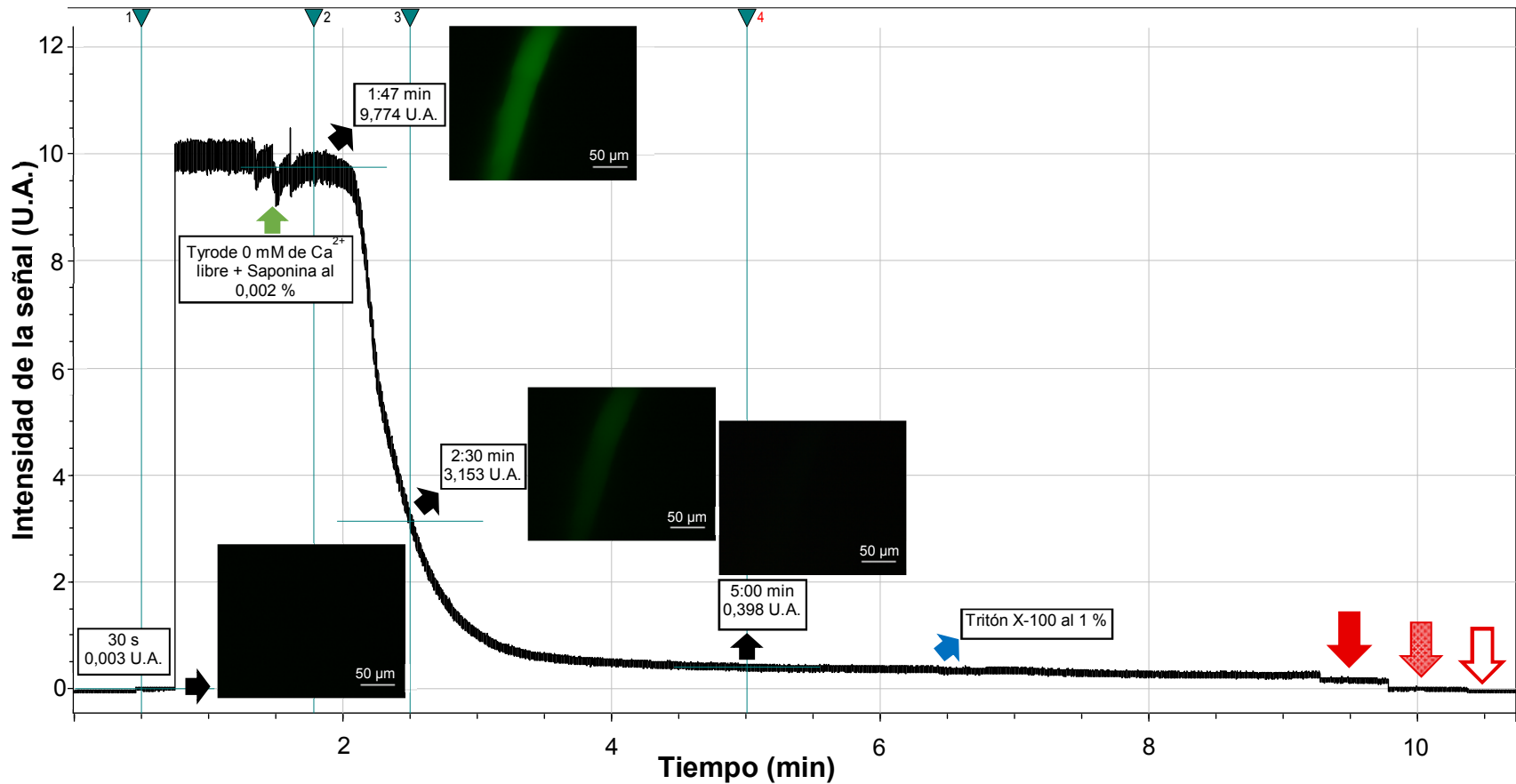


Figura 6. Registro por fotomultiplicador de la F_{min} y compartimentalización del indicador Mag-Fluo-4 acompañado de imágenes obtenidas por cámara acoplada al microscopio. Flecha verde: Adición de Tyrode 0 mM de Ca²⁺ libre + Saponina al 0,002 % con 50 μM de BTS y 15 μM de CPA. Flecha azul: Adición de Tritón X-100 al 1 %. Flecha roja solida: Registro de la fluorescencia de fondo. Flecha roja punteada: Registro de la señal con la fuente de luz apagada. Flecha contorno rojo: Registro de la señal con el puerto del fotomultiplicador cerrado.

Determinación de la K_d

Después de registrar los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} y adicionar los 15 μM de CPA + 50 μM de BTS disueltos en 200 μL de la solución calibradora las células de interés dejaban de contraerse, pero seguían generando transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} con una menor amplitud.

Adquirimos por medio del fotomultiplicador los registros de las señales de fluorescencia del indicador en presencia de las diferentes soluciones calibradoras con concentraciones conocidas de Ca^{2+} libre, partiendo de una F_{basal} corregida de $9,76 \pm 0,28$ U.A ($n=29$). Después del estímulo con la solución calibradora las señales de fluorescencia presentaron un incremento de la señal con respecto a la F_{basal} (Fig. 7A), únicamente en los registros con la solución calibradora de 100 nM las señales disminuyeron con respecto a la F_{basal} .

Observamos que después de estimular las células con las soluciones calibradoras de Ca^{2+} libre con 1 μM ($n=5$), 4 μM ($n=4$) o 40 μM ($n=3$), la señal registrada decaía con respecto a la F_{basal} en $2,616 \pm 0,803$ U.A., $1,749 \pm 0,196$ U.A. y $1,992 \pm 1,510$ U.A., respectivamente, seguido de un incremento de la señal (Fig. 7A). En promedio la señal de la F_{basal} decayó ($n=12$) de $9,666 \pm 0,3$ U.A. a $7,494 \pm 0,831$ U.A., lo que representa una disminución de 22,47 % en la señal.

En tres de los registros en los que se estimularon las células con la solución calibradora con 1 mM de Ca^{2+} libre observamos que luego de adicionar los 15 μM de CPA + 50 μM de BTS obtuvimos un pico en la señal con una amplitud de $7,863 \pm 3,224$ U.A. con respecto a la F_{basal} , señal que posteriormente decayó hasta

la F_{basal} . Realizamos un experimento estimulando la célula con la solución calibradora con 10 mM Ca^{2+} y adicionamos primero los 50 μM de BTS y 5 min después los 15 μM de CPA obteniendo un pico en la señal con una amplitud de 10,089 U.A. con respecto a la F_{basal} . El pico solo se presentó después de que adicionamos los 15 μM de CPA.

Graficamos los valores máximos promedio de las señales después del estímulo para cada una de las concentraciones de Ca^{2+} libre conocidas, corregidos por la autofluorescencia (Tabla 3) en función del pCa^{2+} , realizamos un ajuste de Boltzmann y determinamos que la K_d *in situ* del indicador Mag-Fluo-4 en células del músculo FDB de ratón es 118,9 μM (Fig. 7B).

Tabla 3. Valores máximos promedio de las señales después del estímulo para cada una de las concentraciones de Ca^{2+} libre conocidas

[Ca²⁺] libre	<i>n</i>	Valores máximos corregidos en U.A. (media±DE)
100 nM	5	0,127±0,048
1 μM	5	19,890±2,624
4 μM	4	20,731±1,501
40 μM	3	51,64±4,964
100 μM	2	55,412±10,259
1 mM	5	69,365±8,438
10 mM	5	123,539±18,583

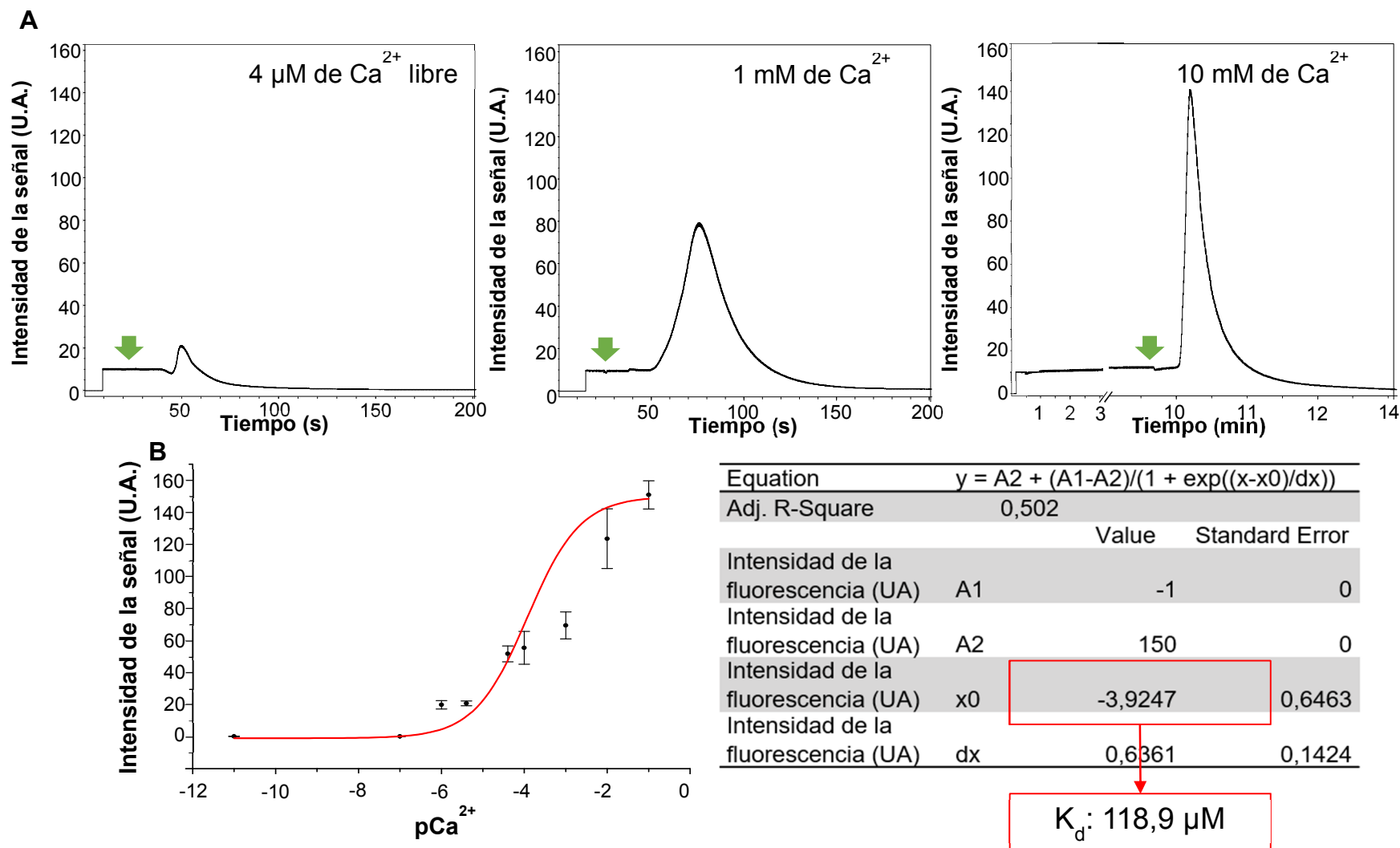


Figura 7. Determinación de la K_d del indicador Mag-Fluo-4. (A) Registro del cambio de la señal de fluorescencia del indicador Mag-Fluo-4 en el tiempo en presencia de tres diferentes soluciones calibradoras de Ca^{2+} + Saponina 0,002 % (Flecha verde). (B) K_d estimada mediante la ecuación de Boltzmann (descrita en B, panel derecho) a partir de los valores máximos de las señales de fluorescencia corregidos por la autofluorescencia en función del pCa^{2+} .

Determinación de la $F_{m\acute{a}x}$

En el ensayo previo para asegurar que la se\u00f1al de fluorescencia obtenida en los experimentos correspond\u00eda a la se\u00f1al del indicador en condiciones saturantes de Ca^{2+} , determinamos que no hay diferencias estad\u00edsticamente significativas entre las DIC al estimular con Tyrode 50 mM de Ca^{2+} libre o Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre con Saponina al 0,002 %, sin importar el nivel de excitaci\u00f3n de la l\u00e1mpara de fluorescencia utilizado. Tampoco encontramos diferencias significativas entre las F_{basal} Nivel 1 y Nivel 2 pero s\u00ed con las dem\u00e1s variables evaluadas (Fig. 8).

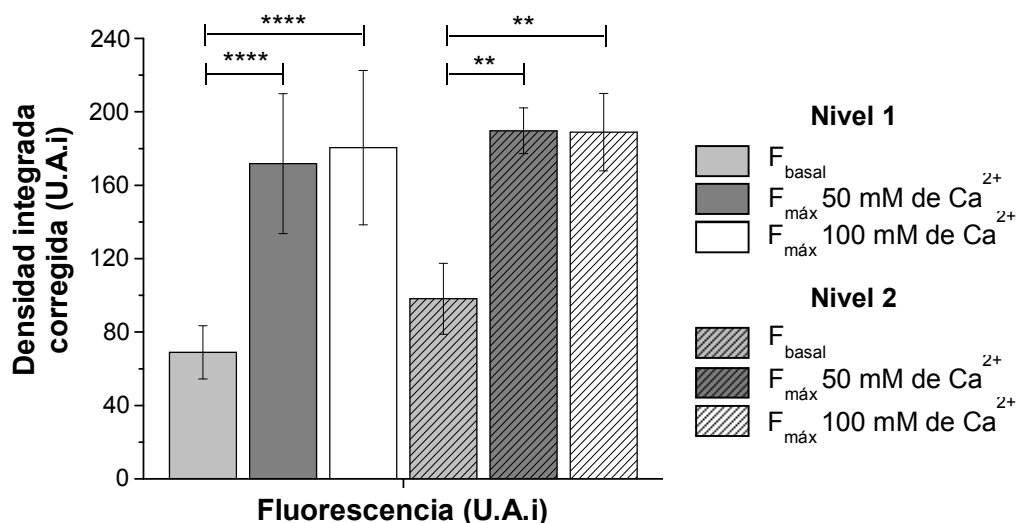


Figura 8. An\u00e1lisis de la densidad integrada corregida (DIC) a concentraciones saturantes de Ca^{2+} . Las DIC de la F_{basal} Nivel 1 ($68,97 \pm 14,48$ U.A.i, $n=18$) y Nivel 2 ($98,13 \pm 19,34$ U.A.i, $n=18$) no fueron significativamente diferentes entre ellas, pero s\u00ed presentaron diferencias con las dem\u00e1s variables evaluadas. No se encontraron diferencias significativas entre la $F_{m\acute{a}x}$ a 50 mM de Ca^{2+} Nivel 1 ($171,8 \pm 38,1$ U.A.i, $n=9$) y Nivel 2 ($189,7 \pm 12,45$ U.A.i, $n=9$), la $F_{m\acute{a}x}$ a 100 mM de Ca^{2+} Nivel 1 ($180,51 \pm 42,07$ U.A.i, $n=9$) y Nivel 2 ($188,9 \pm 21,07$ U.A.i, $n=9$) ($P > 0,05$). Los valores se muestran como media \pm DE. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$; ANOVA con prueba post-hoc de Tukey.

Los experimentos en los que estimulamos las c\u00e9lulas con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + Saponina al 0,002 % (Fig. 9) presentaron un pico m\u00e1ximo de fluorescencia

corregido por la autofluorescencia correspondiente a la $F_{\text{máx}} \text{ corregida}$ de $150,889 \pm 8,798$ U.A. ($n=8$), a partir de una $F_{\text{basal}} \text{ corregida}$ de $9,785 \pm 0,448$ U.A. Este pico se presentó a los $40,43 \pm 14,14$ s después de adicionar el estímulo, con un tiempo de ascenso de $4,62 \pm 1,988$ s ($n=7$). El ascenso fue constante y limpio, seguido de una caída rápida de la señal.

Cuando estimulamos las células con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + 40 μM de Ionomicina (Fig. 10) obtuvimos un pico máximo de fluorescencia corregido por la autofluorescencia correspondiente a la $F_{\text{máx}} \text{ corregida}$ de $102 \pm 27,402$ U.A. ($n=9$) a partir de una $F_{\text{basal}} \text{ corregida}$ de $10,081 \pm 0,286$ U.A. Este pico se presentó a los $84,38 \pm 18,715$ s después de adicionar el estímulo, con un tiempo de ascenso de $26,11 \pm 11,018$ s ($n=8$). El pico máximo fue menor (Fig. 11), el ascenso menos constante y la caída más lenta en comparación con los registros en donde se estimuló la célula con Saponina. $***P < 0,001$; t-test para variables no apareadas.

Las células presentaron una longitud antes del estímulo con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS de $432 \pm 41,57$ μm y después del estímulo de $313 \pm 55,031$ μm ($n=6$), lo que representa una reducción del 28 ± 6 % en la longitud de las células tras el estímulo (Fig. 12). No medimos los cambios en la longitud de las células cuando se estimularon con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + 40 μM de Ionomicina y 50 μM de BTS, pero observamos un acortamiento similar a los obtenidos cuando estimulamos las células con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS. Lo que nos hace pensar que la reducción en el tamaño es causada por la alta concentración del Ca^{2+} y no del ionóforo utilizado.

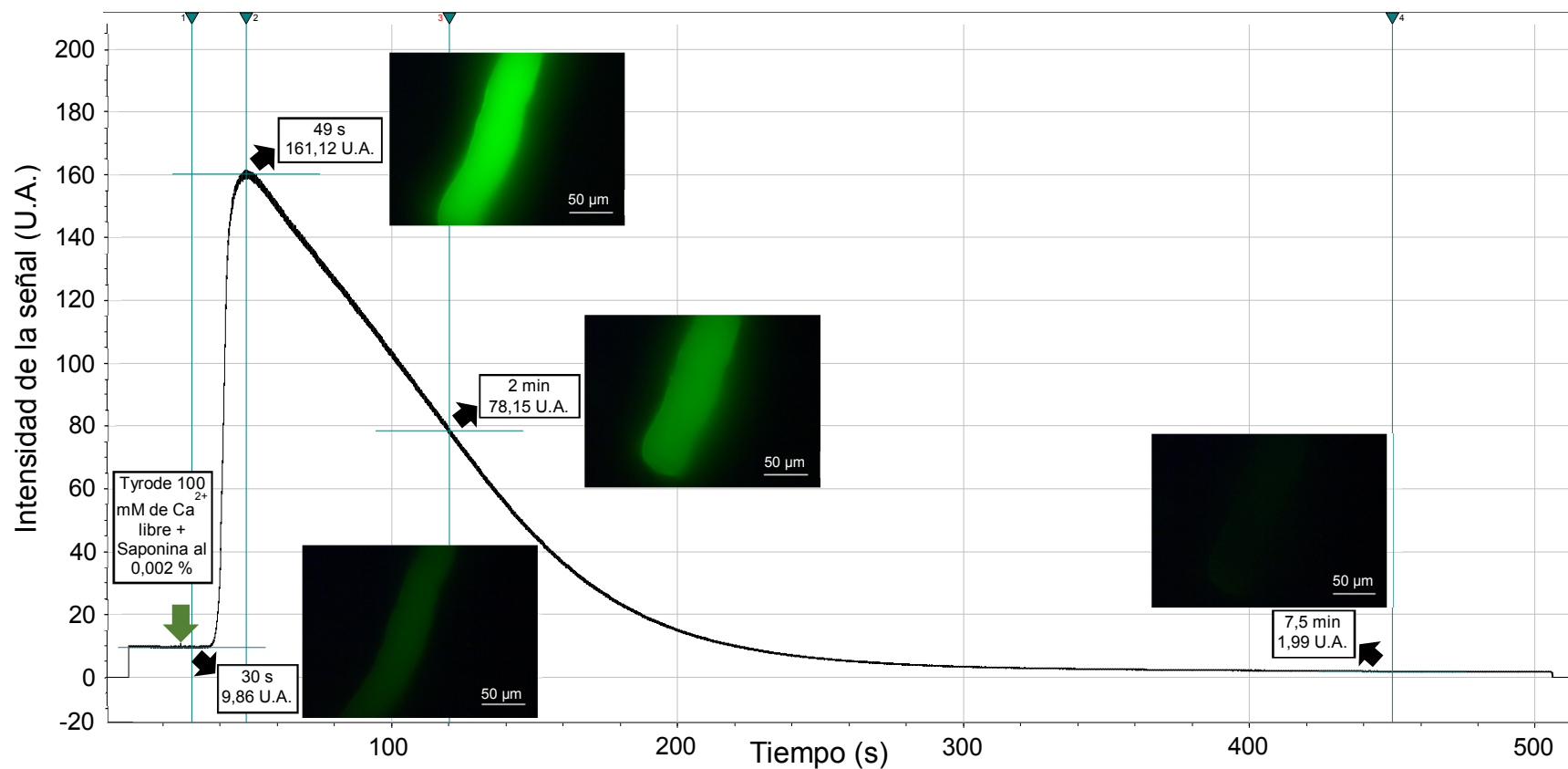


Figura 9. Determinación de la fluorescencia máxima con Saponina. Registro por fotomultiplicador de la $F_{\text{máx}}$ del indicador Mag-Fluo-4 acompañado de imágenes obtenidas por cámara acoplada al microscopio. Flecha verde: Adición de Tyrode con 100 mM de Ca²⁺ libre con Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS.

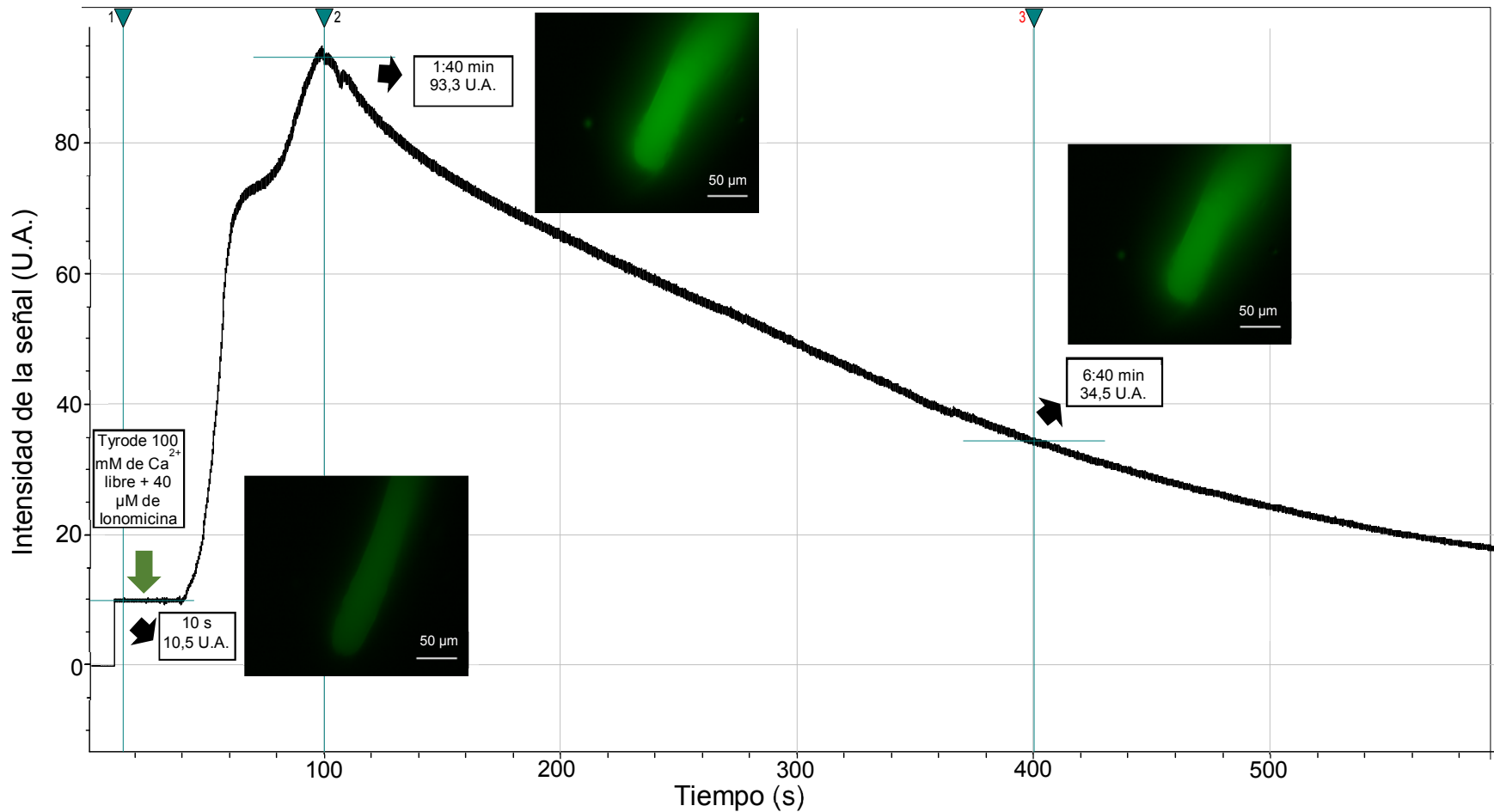


Figura 10. Determinación de la fluorescencia máxima con Ionomicina. Registro por fotomultiplicador de la $F_{\text{máx}}$ del indicador Mag-Fluo-4 acompañado de imágenes obtenidas por cámara acoplada al microscopio. Flecha verde: Adición de Tyrode con 100 mM Ca^{2+} libre con 40 μM de Ionomicina y 50 μM de BTS.

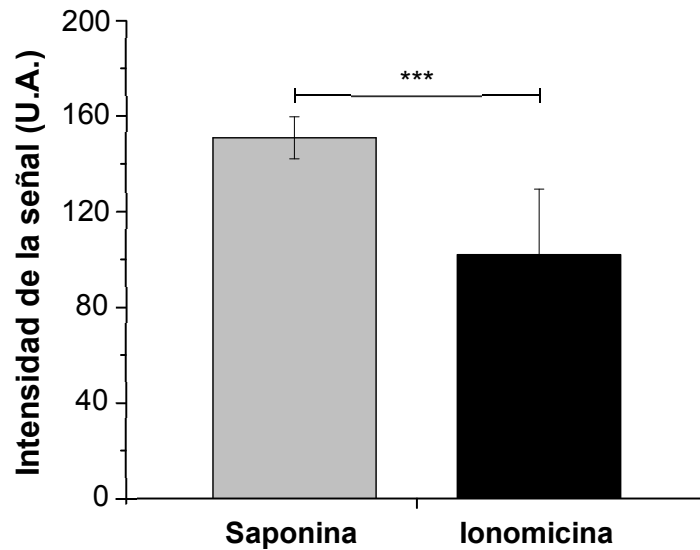


Figura 11. Comparación de las $F_{\text{máx}}$ corregidas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las $F_{\text{máx}}$ corregidas cuando las células se estimularon con Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + Saponina al 0.002 % (150,889±8,798 U.A., $n=8$, barra gris) o Tyrode 100 mM de Ca^{2+} libre + 40 μM de Ionomicina (102±27,402 U.A., $n=9$, barra negra). Los valores se muestran como media±DE. *** $P<0,001$; t-test para variables no apareadas.

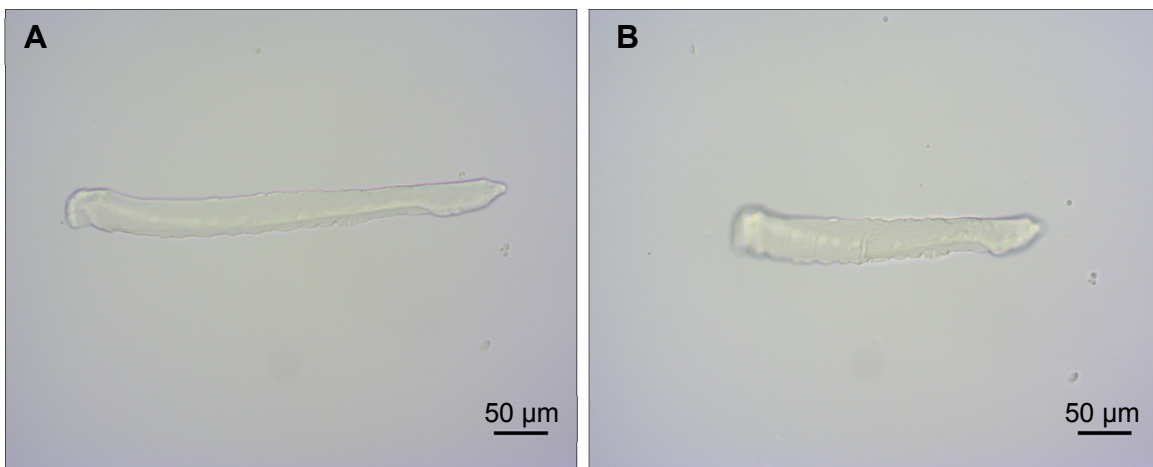


Figura 12. Cambio de la longitud de la célula en la determinación de la $F_{\text{máx}}$. (A) Célula en campo claro antes del estímulo con Tyrode con 100 mM de Ca^{2+} libre, Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS. (B) Célula en campo claro después del estímulo con Tyrode con 100 mM de Ca^{2+} libre, Saponina al 0,002 % y 50 μM de BTS. Esta célula se acortó un 29 %.

Calibración de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} en términos de concentración de Ca^{2+}

Para reducir el ruido de la señal, realizamos un promedio de 5 transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} , corregimos estos valores por la autofluorescencia y los regraficamos (Fig. 13A), reemplazamos estos valores, la F_{min} corregida, la $F_{\text{máx}}$ corregida y la K_d en la ecuación de Grynkiewicz, Poenie & Tsien (ecuación 1) para determinar cada valor a qué concentración de Ca^{2+} equivalía y graficamos estos valores en función del tiempo (Fig. 13B).

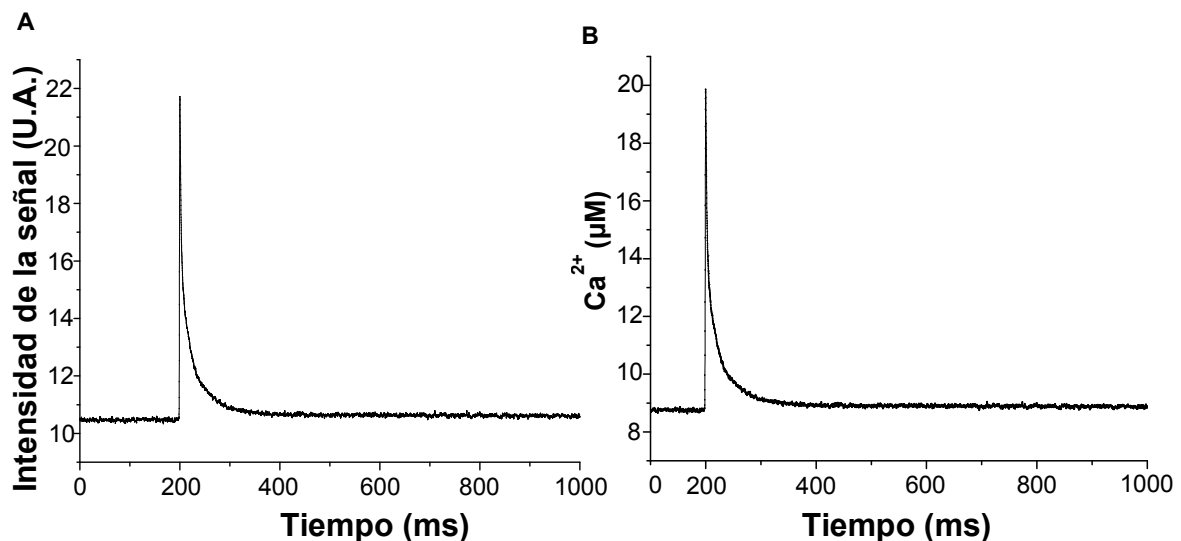


Figura 13. Transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} en términos de concentración de Ca^{2+} . (A) Promedio de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de una sacudida simple obtenido experimentalmente en términos del cambio en la intensidad de fluorescencia del indicador Mag-Fluo-4 en U.A en el tiempo ($n=5$). (B) Promedio de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de una sacudida simple expresado en términos del cambio de la concentración de Ca^{2+} en el tiempo empleando la ecuación 1 ($n=5$).

Establecimos que las células del músculo FDB de ratones adultos de la cepa C57BL/6J ($n=14$) tienen una concentración de Ca^{2+} libre basal en el citoplasma de aproximadamente $8,7\pm 0,4 \mu\text{M}$ y después de un estímulo eléctrico la concentración de Ca^{2+} libre se puede incrementar hasta $17,37\pm 4,10 \mu\text{M}$ en el citoplasma, presentando un cambio de $8,67 \mu\text{M}$.

En el análisis matemático realizado a la F_{basal} asumimos que el Mag-Fluo-4 tiene una K_d para Mg^{2+} de $4,7 \text{ mM}$ (reportada por el fabricante *in vitro*) y una K_d para Ca^{2+} de $118,9 \mu\text{M}$ (determinada *in situ* en nuestros experimentos), concentraciones intracelulares del indicador de $200 \mu\text{M}$ o $400 \mu\text{M}$, 100 nM para el Ca^{2+} y 1 mM para el Mg^{2+} . Al reemplazar estos valores en las ecuaciones 3.4, 3.5 y 3.6, observamos que del indicador unido a un ion solo el $0,4\%$ ($0,069 \times 100 / 0,069 + 17,532$) está unido al Ca^{2+} y el $99,6 \%$ restante está unido al Mg^{2+} , independiente de la concentración del indicador total. Si consideramos que la K_d del indicador para el Mg^{2+} determinada *in vitro* posiblemente es menor que *in situ* estaríamos sobre estimando el porcentaje de indicador unido a Mg^{2+} . Si asumimos que al realizar el ajuste con las K_d determinadas *in vitro* para Ca^{2+} de $22 \mu\text{M}$ y para Mg^{2+} de $4,7 \text{ mM}$ introducimos un error proporcional, obtenemos que del indicador unido a un ion el $2,09 \%$ ($0,373 \times 100 / 0,373 + 17,478$) está unido al Ca^{2+} y el $97,91 \%$ restante está unido al Mg^{2+} , independiente de la concentración del indicador total (Tabla 4).

Tabla 4. Indicador libre y unido al Ca^{2+} y al Mg^{2+} en estado de reposo para dos concentraciones del indicador.

[I _T] (μM)	K_d Ca^{2+} (μM)	[Ca^{2+}] (μM)	[Mg^{2+}] (μM)	[I _{Libre}] (μM)	[Ca^{2+} I] μM	[Mg^{2+} I] μM	I _{Libre} (%)	Ca^{2+} I (%)	Mg^{2+} I (%)
200	118,9	0,1	1000	164,798	0,139	35,063	82,4	0,069	17,532
400	118,9	0,1	1000	329,596	0,277	70,127	82,4	0,069	17,532
200	22	0,1	1000	164,297	0,747	34,957	82,1	0,373	17,478
400	22	0,1	1000	328,593	1,494	69,913	82,1	0,373	17,478

Asumiendo que el Mag-Fluo-4 tiene una K_d in vitro para Mg^{2+} de 4,7 mM

Si el 0,4 % de la $F_{\text{basal corregida}}$ determinada en los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} ($10,387 \pm 0,487$ U.A, $n=14$) corresponde a la fluorescencia emitida por la unión del indicador con el Ca^{2+} , en realidad nuestra $F_{\text{basal corregida}}$ sería de $0,0415 \pm 0,002$ U.A. Para asumir condiciones *in situ* sumamos a este valor la F_{min} , obteniendo una señal correspondiente al indicador unido a Ca^{2+} de $0,185 \pm 0,002$ U.A. y un pico máximo de $19,25 \pm 3,9$ U.A. Reemplazamos estos valores en la ecuación de Grynkiewicz, Poenie & Tsien (ecuación 1) y determinamos que los transitorios de fluorescencia tenían una concentración Ca^{2+} basal ajustada de $30 \pm 0,002$ nM y un pico en la concentración de Ca^{2+} tras el estímulo de $17,37 \pm 4,10$ μM .

Si realizamos el mismo procedimiento asumiendo que el 2,09 % de la $F_{\text{basal corregida}}$ determinada en los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} ($10,387 \pm 0,487$ U.A, $n=14$) corresponde a la fluorescencia emitida por la unión del indicador con el Ca^{2+} , obtenemos que $F_{\text{basal corregida}}$ sería de $0,217 \pm 0,010$ U.A, asumiendo condiciones *in*

situ sumando la F_{\min} , obtenemos una señal correspondiente al indicador unido a Ca^{2+} de $0,360 \pm 0,010$ U.A. y un pico máximo de $19,25 \pm 3,9$ U.A. Al reemplazar estos valores en la ecuación de Grynkiewicz, Poenie & Tsien (ecuación 1) determinamos que los transitorios de fluorescencia presentan una concentración Ca^{2+} basal ajustada de $171 \pm 0,008$ nM y un pico de $17,37 \pm 4,10$ μM tras una sacudida simple (n=14).

Discusión

Obtención de las células musculares y evaluación de la viabilidad celular

La obtención de células musculares intactas es una metodología de gran utilidad para la investigación en las áreas de Fisiología y Biofísica muscular. Basados en la técnica de disociación enzimática descrita por Bekoff & Betz en 1977 se han obtenido grandes cantidades de células de diferentes músculos y especies de mamíferos que conservan sus características morfológicas y funcionales (Szentesi *et al.* 1997; Capote *et al.* 2005; Caputo, Bolaños & González, 2004; Calderón & Figueroa, 2009; Calderón *et al.* 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2011; López *et al.* 2015; Cully *et al.* 2016).

En investigaciones previas realizadas en el músculo FDB de ratón de la cepa NMRI se reportaron condiciones para la disociación enzimática de 4 mg/mL de colagenasa por 60 min a 36 °C (Capote *et al.* 2005; Bolaños *et al.* 2008), de 3 mg/mL de colagenasa entre 52 y 64 min a 36,5 °C (Calderón *et al.* 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2011) y en músculo FDB de las cepas de ratones DBA y FVB utilizaron 2 mg/mL de colagenasa durante 3 h a 37 °C. (González, 2004).

Observamos que en general en las investigaciones anteriores la concentración de la enzima y el tiempo de incubación fueron menores a los de nuestro estudio, esto se debe posiblemente a que en la cepa C57BL/6J el músculo FDB esté rodeado de una mayor cantidad de tejido conectivo.

También es importante considerar la edad de los animales pues la composición en los tipos de células musculares varía según la etapa de la vida. Al momento de nacer las células musculares no se encuentran diferenciadas y durante las primeras semanas de vida ocurren cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos que permiten alcanzar las propiedades características de los músculos de ratones adultos (Ward & Wareham, 1985). Por ejemplo, en células de FDB de ratones entre 10 y 15 días de edad la fase ascendente de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} tiene un tiempo de ascenso más lento en comparación con la de los adultos (Capote *et al.* 2005, Calderón *et al.* 2009). Nosotros empleamos en todos nuestros experimentos ratones con más de 7 semanas para garantizar que las células eran maduras y los transitorios de fluorescencia estables en el tiempo (Capote *et al.* 2005).

Consideramos que en futuras investigaciones en las que se utilice como modelo células del músculo FDB de la cepa de ratón C57BL/6J nuestro protocolo estandarizado de disección y disociación será de gran utilidad para la obtención de una suspensión rica en células viables.

Con respecto a la visualización por microscopía óptica en campo claro de las características morfológicas de las células, observamos que aquellas células alargadas, brillantes y con membrana definida conservaban su funcionalidad pues

presentaban contracción ante estímulos eléctricos y generaban transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} (resultados que se discutirán más adelante).

Es importante destacar que la evaluación de las características morfológicas, la contracción frente a estímulos eléctricos y el registro de transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} , demuestran que las células eran fisiológicamente intactas antes de comenzar los procedimientos de calibración.

Nuestro modelo experimental se ajusta más a la definición de *ex vivo*, pero típicamente en el área cuando se han realizado calibraciones de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} dentro de la célula se ha denominado *in situ* (Petr & Wurster, 1997; Cully *et al.* 2016; Friedrich & Head, 2017) y cuando se han realizado en cubeta se ha denominado *in vitro* (Delbono & Stefani, 1993; Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Baylor & Hollingworth, 2011; Cully *et al.* 2016). Dado su uso extendido y la visibilidad que nos genera en las bases de datos, preferimos seguir utilizando el término *in situ*. Sin embargo, esperamos incluir este punto en la discusión en una futura publicación.

Carga de las células con el indicador fluorescente de Ca^{2+} y determinación de la autofluorescencia

Los indicadores fluorescentes son agentes exógenos que pueden interferir con la función celular, por lo tanto, se debe utilizar la concentración más baja posible (Cobbold & Rink, 1987; Hu, Yu & Yu, 2005). Cuando se utilizan indicadores en la forma AM es difícil conocer la concentración que se alcanza a nivel intracelular, así se conozca la concentración total del indicador adicionada externamente, pues

una vez la molécula del indicador está en las células y el grupo éster AM ha sido separado por esterasas intracelulares, representa una molécula diferente atrapada dentro del citosol y las moléculas de indicador desesterificadas se seguirán acumulando (Friedrich & Head, 2017).

Investigaciones previas han reportado la carga de las células de FDB de ratones de la cepa NMRI con Mag-Fluo-4, AM a concentraciones de: 10 μM entre 30 y 40 min (Capote *et al.* 2005; Caputo, Bolaños & González, 2004) y 60 min (Calderón *et al.* 2009), 8-10 μM entre 35 y 45 min (Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2011, Calderón *et al.* 2013). También se han cargado células de *extensor digitorum longus* (EDL) de ratones RAmKO con 10 μM de Mag-Fluo-4, AM entre 10 y 15 min (López *et al.* 2015). Hasta donde conocemos, hemos utilizado una concentración y tiempo de carga del indicador menor a los reportados en la literatura, obteniendo transitorios de fluorescencia comparables a los publicados previamente (ver adelante).

Teniendo en cuenta la $F_{\text{máx}}$ obtenida, determinamos que bajo nuestras condiciones de carga al registrar los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} solo utilizamos el 12,5 % de la fluorescencia posible dada por del indicador, por lo que consideramos que se pueden estandarizar condiciones que permitan una menor carga de la célula con el fluoróforo, lo que reducirá el riesgo de presentar alteraciones fisiológicas, disminución en el tiempo de los experimentos y aumento en el rendimiento del reactivo.

Si bien no determinamos la concentración intracelular del indicador utilizada en nuestros experimentos, una forma de controlar que la concentración alcanzada

intracelularmente en todas las células sea aproximadamente la misma al momento de realizar los experimentos es siendo riguroso con la concentración extracelular utilizada, el tiempo de carga, cantidad de lavados y periodo de tiempo para la experimentación, tal como hicimos en este caso. Además, la baja variabilidad observada en los experimentos de $F_{m\acute{a}x}$ sugiere que siempre obteníamos concentraciones de indicador comparables entre las células.

En las células hay constituyentes que pueden emitir autofluorescencia como los componentes del tejido conectivo, las fibras de colágeno, las calcificaciones, los nucleótidos de piridina (NADH, NADP), el mononucleótido de flavina (FMN) y el dinucleótido de adenina y flavina (FAD) (Hu, Yu & Yu, 2005). El FAD tiene un pico de excitación de 450 nm y una emisión entre 530 y 550 nm, (Harbig *et al.* 1976) compartiendo rangos de emisión y excitación con nuestro indicador.

Para eliminar la influencia de esos constituyentes sobre nuestras señales, determinamos los valores de autofluorescencia en nuestra preparación y los restamos de todos los registros. En general, el impacto de la autofluorescencia en nuestros experimentos fue mínimo. Por ejemplo, en los registros de la F_{basal} la autofluorescencia representó menos del 0,5 %. Petr & Wurster en 1997 corrigieron la autofluorescencia en la calibración *in situ* del indicador Fura-2 en la línea celular de astrocitos U373-MG, mientras que en los resultados de la calibración *in situ* del indicador Fluo-4 en cardiomiocitos de rata realizada por Ljubojevc *et al.* en 2011 no se reportó si este valor se consideró.

Caracterización de los transitorios de fluorescencia de Ca²⁺

Al analizar los transitorios de fluorescencia obtenidos en esta investigación, observamos que cumplen con las características generales que presenta un transitorio de fluorescencia de Ca²⁺ de células musculares reportadas en diferentes investigaciones (Delbono & Stefani, 1993; Jacquemond, 1997; Caputo, Bolaños & González, 2004; Capote *et al.* 2005; Calderón *et al.* 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a; 2014).

Tarpey *et al.* en 2018 caracterizaron los tipos de fibras que componen el músculo FDB de ratones machos adultos de la cepa C57/BL6, reportando que la totalidad del músculo tiene un 4,4±2,9 % de células tipo I, un 43,9±1,9 % de células tipo IIA y un 51,6±4,8 % de células IIX, estos resultados concuerdan con datos nuestros no publicados donde usamos anticuerpos para clasificar los tipos de fibras del FDB. Al músculo FDB ser heterogéneo en su composición es importante determinar el tipo de fibra utilizada en los experimentos. Calderón *et al.* en 2009 empleando células musculares de FDB de ratones machos de la cepa NMRI entre 42 y 49 días de edad cargadas con Mag-Fluo-4, AM, clasificaron la morfología de los transitorios de fluorescencia de Ca²⁺ en dos tipos: morfología tipo I (MT-I) que incluye las fibras I y IIA, y morfología tipo II (MT-II) que incluye las fibras IIX y IIB.

Comparamos los parámetros cinéticos de nuestros transitorios de fluorescencia (Fig. 5B) con los reportados por Calderón *et al.* en 2009 para cada morfología (Fig. 14), en términos generales, los parámetros cinéticos de nuestros transitorios se asemejan más a los MT II, que, a los MT I, como era de esperarse. Como partimos de valores reportados como media±SEM los datos no pudieron ser sometidos a

análisis estadístico. Las pequeñas diferencias observadas entre nuestros datos y las MT II de ratones previamente publicados se podrían explicar posiblemente por tratarse de cepas de ratones diferentes y la diferencia en la edad de estos.

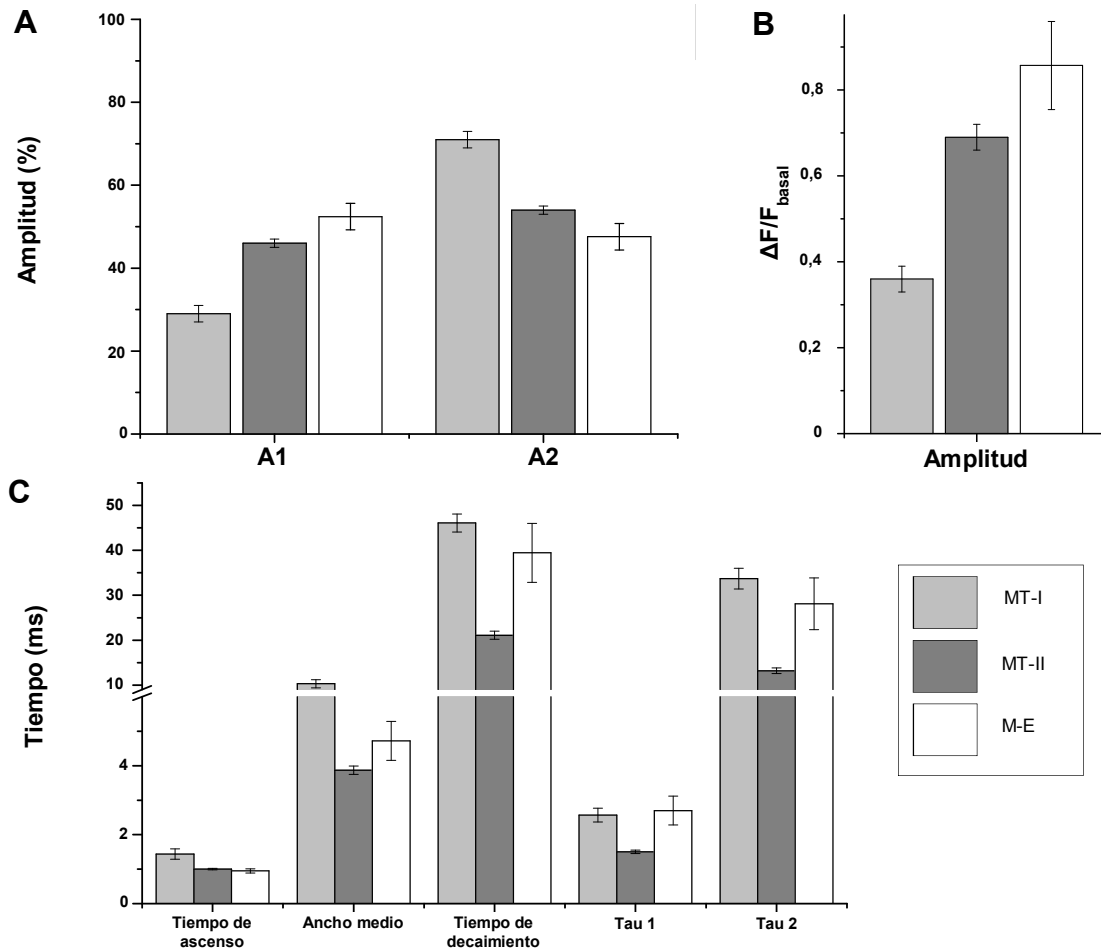


Figura 14. Comparación de los parámetros cinéticos de los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de músculo FDB de ratón. (A) Variables medidas en porcentaje. **(B)** Variables relacionadas con la fluorescencia **(C)** Variables medidas en ms. La barra blanca corresponde a los parámetros obtenidos experimentalmente en este trabajo (M-E, $n=14$), la barra gris claro corresponde a los parámetros de morfología tipo I (MT-I, $n=11$) y la barra gris oscuro a los parámetros de la morfología tipo II (MT-II, $n=47$), estos dos últimos fueron graficados a partir de los datos reportados por Calderón *et al.* 2009. Los valores se muestran como $media \pm SEM$.

Los resultados de MT-II son coherentes con la inhibición de la contracción muscular frente a estímulos eléctricos evidenciada en nuestros experimentos cuando las células se incubaron con 50 μM de BTS. El BTS a bajas concentraciones es un inhibidor selectivo de la actividad ATPasa de la miosina II del músculo esquelético, inhibiendo la contracción de las células tipo II, esta propiedad se ha utilizado en otras investigaciones para discriminar los tipos de células (Cheung *et al.* 2002; Shaw, Ostap & Goldman, 2003; Calderón *et al.* 2009; Cully *et al.* 2016). En conjunto estos resultados nos permiten concluir que los resultados obtenidos en esta investigación corresponden a células musculares tipo IIX.

Determinación de la F_{\min} y compartimentalización del indicador

Dado que la F_{\min} depende de la concentración del indicador utilizada (Olivera & Pizarro, 2018), al no conocerse la concentración del indicador intracelular posterior a la carga con la forma AM, la F_{\min} debe ser calculada *in situ* bajo las condiciones experimentales estandarizadas. La determinación de la F_{\min} mediante la adición de Tyrode 0 mM de Ca^{2+} libre con Saponina al 0,002 %, 15 μM de CPA y 50 μM de BTS, arrojó resultados reproducibles y confiables.

Utilizar el indicador en la forma AM es una técnica no invasiva y sencilla de cargar las células con indicadores fluorescentes. Sin embargo, este método puede presentar algunos problemas como la compartimentalización, que puede introducir importantes fuentes de error en las mediciones. La compartimentalización ocurre cuando el indicador en la forma AM ingresa a compartimientos intracelulares

donde es desesterificado y se puede unir a iones emitiendo fluorescencia permanentemente (Hu, Yu & Yu, 2005).

Li, Sul & Haydon en 2003 reportaron que en astrocitos corticales de ratones cargados con Mag-Fluo-4, AM por 45 min a 37 °C el indicador tenía preferencia por compartimientos intracelulares, especialmente el RS. Olivera & Pizarro en 2018 emplearon el indicador Mag-Fluo-4, AM para registrar el cambio en las concentraciones de Ca^{2+} a nivel de RS cargando las células por 1 h con el indicador, reportaron que si utilizaban periodos de carga más cortos (30 min) las células mostraban una señal proveniente del citoplasma y no del RS. Calderón *et al.* en 2013 reportaron en células de FDB cargadas entre 8 y 10 μ M del indicador Mag-Fluo-4, AM por 40 min a 21-22 °C una compartimentalización menor al 10 %. Nosotros obtuvimos un porcentaje de compartimentalización menor en nuestros experimentos ($1,1 \pm 0,7$ %), probablemente por la reducción que hicimos de la concentración y tiempo de carga del indicador, así como la baja temperatura a la que cargamos (ambiente, típicamente 23-25 °C).

Determinación de la K_d

Se conoce que la K_d de la mayoría de los indicadores de Ca^{2+} *in vitro* es menor a la K_d *in situ*. Esto se debe a que en la célula la K_d se ve influenciada por variables ambientales como la fuerza iónica, la temperatura, el pH, la presión, la viscosidad o presencia de otros sitios de unión como proteínas de unión a Ca^{2+} o cationes divalentes tales como Mg^{2+} (Hu, Yu & Yu, 2005; Friedrich & Head en 2017). Por lo tanto la K_d también puede variar entre un tipo de célula y otra.

El fabricante reporta en el catálogo del indicador Mag-Fluo-4 una K_d de 22 μM *in vitro* a 22 °C, Hollingworth, Gee & Baylor, 2009 reportaron una K_d de 70 μM *in vitro* a 21 °C, Calderón *et al.* en 2013 reportaron una k_d *in vitro* de 21,6 μM , 27,8 μM y 29,1 μM en presencia de 0, 1 y 2 mM de Mg^{2+} libre, respectivamente, a 20 °C. Olivera & Pizarro en 2018 estimaron una K_d *in vitro* de 90 μM . Nuestra K_d determinada *in situ* (118,9 μM) fue mayor que todos los datos anteriormente reportados *in vitro* para Mag-Fluo-4, como era esperado por la presencia de proteínas dentro las células musculares.

Comparaciones de las K_d determinadas *in vitro* e *in situ* para otros indicadores han demostrado diferencias hasta cinco veces más alta en los valores determinados *in situ* (Hu, Yu & Yu, 2005), observación que concuerda con nuestros resultados, lo que resalta la importancia de determinar la K_d directamente en la célula de estudio.

Se recomienda usar al menos 6 puntos para construir la curva de calibración (Friedrich & Head en 2017), nosotros utilizamos 9 puntos incluyendo la F_{min} y la $F_{\text{máx}}$. Consideramos que cada punto debe de tener al menos 5 réplicas, este número no se logró en los experimentos de 4 μM , 40 μM y 100 μM de Ca^{2+} libre por agotamiento de la solución calibradora, pero ya tenemos previsto completar el número de experimentos. Se incluirán otras concentraciones intermedias. Esperamos que esto mejore la dispersión de los valores de los datos de la curva y el ajuste, lo que probablemente cambiará el x_0 (K_d).

Determinación de la $F_{máx}$

La $F_{máx}$ es un parámetro que se debe determinar *in situ*, calcularlo *in vitro* causará inconsistencias entre la fluorescencia experimental, la F_{min} , la $F_{máx}$ y la K_d , ocasionando una estimación incorrecta de la concentración de Ca^{2+} (Hu, Yu & Yu, 2005).

En indicaciones para determinar *in situ* la $F_{máx}$ de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} recomiendan los ionóforos como Ionocimina y A23187 (Hu, Yu & Yu, 2005; Friedrich & Head en 2017). Westerblad & Allen, en 1991 utilizaron 10 μM de Ionomicina en células de FDB de ratón, Petr & Wurster, en 1997 trabajaron con 10 μM de Ionomicina en la línea celular de astrocitos U373MG, Ljubojevic *et al.* en 2011 usaron A23187 en cardiomiocitos de ratón y Cully *et al.* en 2016 emplearon 50 μM de Ionomicina en células de EDL de ratas.

En nuestros experimentos empleamos Ionomicina y Saponina. La Saponina es un agente conocido por interactuar con las moléculas de colesterol de la membrana celular causando perforaciones, además se ha reportado que en mamíferos la Saponina reduce la capacidad del RS para acumular Ca^{2+} (Launikonis & Stephenson, 1997), propiedad que ayudaría, junto con el CPA a evitar la amortiguación del Ca^{2+} a través del RS en la determinación de los diferentes parámetros necesarios para la calibración *in situ*.

La Saponina se ha empleado para permeabilizar membranas celulares de músculo esquelético de rana (Caputo & Bolaños, 1994), cardiomiocitos de rata (Lukyanenko & Gyorke, 1999), células acinares parotídeas (Tojyo, Tanimura &

Matsumoto, 1997) y células de FDB de ratón (Calderón *et al.* 2013). Al comparar los resultados de la $F_{m\acute{a}x}$ obtenidos con Ionomicina ($102\pm 27,402$ U.A.) y Saponina ($150,889\pm 8,798$ U.A) encontramos que, bajo las mismas condiciones, permeabilizar la célula con Ionomicina subestima la $F_{m\acute{a}x}$ del indicador en un 32,4 %, lo que ocasiona una sobreestimación de la concentración de Ca^{2+} . Por ejemplo, cuando determinamos el pico de concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático alcanzado después de un estímulo eléctrico ($n=14$) con la $F_{m\acute{a}x}$ determinada con Saponina, encontramos una concentración de Ca^{2+} libre de $17,37\pm 4,1$ μ M, pero si en la fórmula utilizamos la $F_{m\acute{a}x}$ obtenida con Ionomicina, encontramos una concentración de Ca^{2+} libre de $27,76\pm 7,09$ μ M, lo que representa una diferencia en la concentración de Ca^{2+} del 59,8 %. De nuestros resultados se deduce que algunas concentraciones de Ca^{2+} intracelular publicadas por otros grupos (Westerblad & Allen, 1991; Petr & Wurster, 1997; Cully *et al.* 2016) que utilizaron Ionomicina en sus calibraciones podrían estar sobreestimadas.

Posiblemente esta diferencia se deba a que la permeabilización de la membrana ejercida por la Ionomicina no es suficiente para que ingrese el Ca^{2+} a la célula hasta alcanzar una concentración que sature al indicador, otra posible explicación es que con Ionomicina al ser más lento el ingreso de Ca^{2+} , en la célula se pueden activar mecanismos de remoción Ca^{2+} citoplasmático, también podría pensarse que al permeabilizar con Saponina la célula, el indicador se sale menos antes de alcanzar una concentración saturante Ca^{2+} por lo que presentaría una mayor señal del indicador. Observamos que la acción de la Saponina y la Ionomicina junto con una alta concentración de Ca^{2+} , producen un acortamiento considerable de la

célula como respuesta al estímulo, por lo tanto, no consideramos que esta sea la explicación a las diferencias encontradas.

Calderón *et al.* en 2013 en células de FDB de ratón cargadas entre 8 y 10 μM con el indicador Mag-Fluo-4 por 40 min a una temperatura de 21-22 $^{\circ}\text{C}$, determinaron una $F_{\text{máx}}$ del indicador de 160 ± 14 U.A. permeabilizando la membrana celular con Saponina + 50 mM de Ca^{2+} . La $F_{\text{máx}}$ determinada en nuestros experimentos ($150,889 \pm 8,798$ U.A) está acorde con estos resultados.

Calibración de los transitorios de fluorescencia en términos de concentración de Ca^{2+}

Muchos indicadores fluorescentes de Ca^{2+} tienen sensibilidad al Mg^{2+} , el indicador Mag-Fluo-4 parece presentar una desventaja mayor con respecto a otros indicadores en este aspecto al tener una K_d *in vitro* reportada por el fabricante de 4,7 mM. Se ha reportado que esto genera problemas principalmente en la F_{basal} , dado que, gran parte de esta fluorescencia se deriva del indicador unido a Mg^{2+} y no al Ca^{2+} , tal y como lo calculamos arriba, y como había sido sugerido previamente (Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Baylor & Hollingworth, 2011).

Williams *et al.* en 1990 determinaron una concentración de Ca^{2+} basal de 124 nM en células de FDB en ratones, Shannon & Bers, en 1997 reportaron una concentración de Ca^{2+} basal de 100 nM en cardiomiocitos de rata y Cully *et al.* en 2016 obtuvieron una concentración de Ca^{2+} basal en el orden de 100 nM en células de EDL de rata, concentraciones que son marcadamente inferiores al valor

de la concentración basal de Ca^{2+} ($8,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$) determinado en esta investigación sin realizar la corrección matemática.

La gran diferencia entre nuestros valores y los reportados puede derivar de que nuestra F_{basal} está altamente contaminada con Mg^{2+} , por las siguientes razones:

i) Se ha reportado en la literatura (Hollingworth, Gee & Baylor, 2009 y Baylor & Hollingworth en 2011) que la F_{basal} de algunos indicadores, incluido el Mag-Fluo-4, está altamente influenciada por el Mg^{2+} .

ii) Resultados de Calderón *et al*, 2013, muestran que al cargar las células con $100 \mu\text{M}$ de BAPTA-AM (un quelante de Ca^{2+} y no de Mg^{2+}) (Fig. 15A) la F_{basal} emitida por el indicador Mag-Fluo-4 no se altera, por el contrario si las células se cargan con $200 \mu\text{M}$ EDTA-AM (un quelante de Ca^{2+} y Mg^{2+}) (Fig. 15B) la F_{basal} emitida por el indicador Mag-Fluo-4 se reduce en un $34,3 \pm 3,4 \%$.

iii) Creemos que el decaimiento en la señal observado cuando estimulamos las células con las soluciones calibradoras de Ca^{2+} libre con $1 \mu\text{M}$, $4 \mu\text{M}$ o $40 \mu\text{M}$, las cuales no contenían Mg^{2+} , es producto de la dilución del Mg^{2+} en el medio. La reducción en el $22,47 \%$ en la señal de la F_{basal} evidenciada en nuestros experimentos está acorde con la reducción en la señal en el $34,3 \pm 3,4 \%$ observada por Calderón *et al*. cuando cargaron las células con $200 \mu\text{M}$ EDTA-AM.

iv) Al realizar una corrección matemática obtuvimos una concentración de Ca^{2+} basal de $171 \pm 0,008 \text{ nM}$, este valor es más cercano a los datos reportados en la literatura ya mencionados.

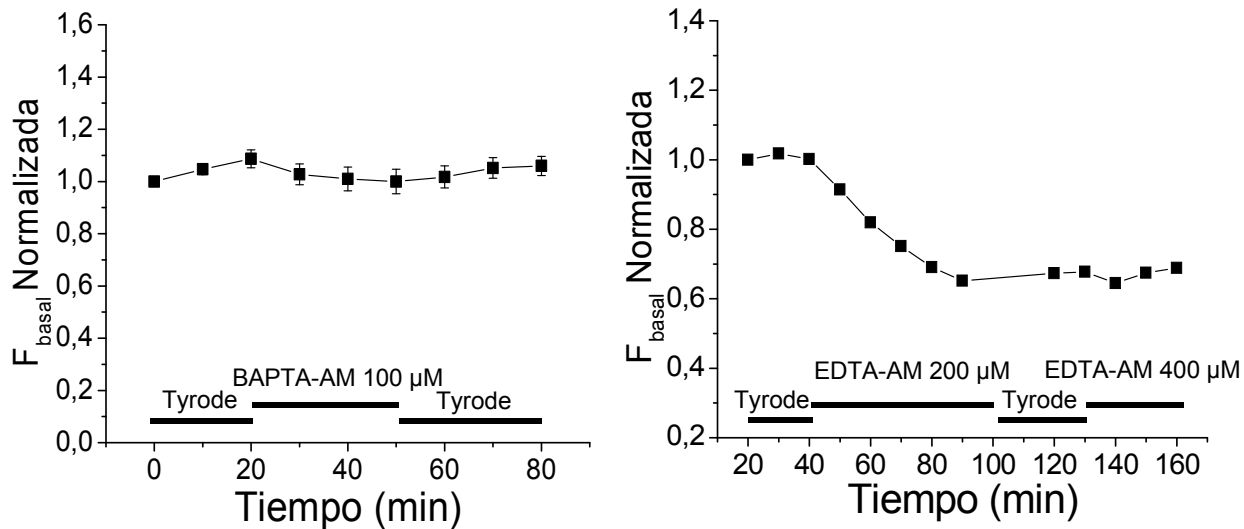


Figura 15. Efecto de cargar las células con quelantes de Ca^{2+} o Mg^{2+} . (A) No se observó ningún efecto sobre la F_{basal} cuando las células se cargaron con 100 μM de BAPTA-AM ($n=13$). En cambio, como se muestra en un registro representativo (B), hubo una reducción de $34,3\pm 3,4\%$ de la F_{basal} cuando las células se cargaron con 200 μM EDTA-AM ($n=7$). Esto sugiere que la F_{basal} depende principalmente del Mg^{2+} libre intracelular. Cortesía de Calderón *et al.* 2013.

Hollingworth, Zhao & Baylor en 1996 reportaron tras una sacudida simple un pico de Ca^{2+} de $17,8\pm 0,4\ \mu\text{M}$ en células de EDL de ratones BALB/c cargadas con Mag-Fura-2. Caputo, Bolaños & González, en 2004, asumieron que la K_d del indicador Mag-Fluo-4 *in situ* era el doble que *in vitro* y determinaron un pico de Ca^{2+} de 24 μM en células de FDB en ratones NMRI. Nosotros encontramos un pico promedio en la concentración de Ca^{2+} libre tras una sacudida simple de $17,37\pm 4,1\ \mu\text{M}$ ($n=14$), valor que concuerda con los resultados anteriormente mencionados. Es importante mencionar que el Mag-Fura-2 y el Mag-Fluo-4 tienen afinidad por el Mg^{2+} , por lo tanto, es importante determinar en futuras investigaciones que

influencia puede tener la concentración de Mg^{2+} libre en el pico máximo de la señal del indicador tras una sacudida simple, aunque la literatura sugiere que durante una sola contracción el Mg^{2+} presenta poca contribución en los cambios en la señal del indicador Mag-Fluo-4 (Konishi *et al.* 1991, Hollingworth, Gee & Baylor, 2009; Calderón, Bolaños & Caputo, 2010a).

Consideraciones finales

Las señales obtenidas en la determinación de los parámetros para la calibración del indicador presentan en general cambios grandes en cortos periodos de tiempo. Consideramos que el uso del fotomultiplicador es una buena metodología para adquirir las señales, pues al permitir grabar los cambios de la señal en el tiempo podemos posteriormente procesar el registro y determinar con precisión la señal en los puntos de interés. También es posible registrar las señales en video a través de una cámara acoplada al microscopio y posteriormente seleccionar la imagen en el tiempo, lo cual requiere de una cámara con alta velocidad y registros de mayor tamaño. Realizar el registro por medio de imágenes fotográficas y determinar posteriormente la DIC, es un proceso que depende del momento en el que el investigador considere el indicado para capturar la imagen. Por la rapidez de la señal muy posiblemente no se logre capturar con precisión el punto de interés, causando errores graves en la determinación de los parámetros. Además, el análisis de imágenes de fluorescencia toma más tiempo que el análisis de los registros derivados del fotomultiplicador.

Es necesario completar el número de experimentos para determinar la K_d , creemos que esto mejorará el ajuste de la curva y nos dará una K_d *in situ* del indicador Mag-Fluo-4 más precisa.

Hu, Yu & Yu en 2005 recomiendan que para un análisis cuantitativo del cambio en las concentraciones de Ca^{2+} libre citoplasmático se debe tener en cuenta la fluorescencia de fondo después de la carga, pues la célula a través de transportadores puede liberar al espacio extracelular indicador desesterificado, que se puede unir a los iones presentes en el medio y sobreestimar la señal intracelular. Debemos determinar bajo nuestras condiciones estandarizadas la fluorescencia de fondo del indicador Mag-Fluo-4 después de la carga.

Consideramos que se debe analizar con mayor profundidad la interferencia del Mg^{2+} en la señal del indicador Mag-Fluo-4 para discutir, según sus ventajas y desventajas, la utilidad de este indicador en el registro de señales provenientes del cambio en las concentraciones de Ca^{2+} libre citoplasmático en células musculares intactas.

Una calibración adecuada del Mag-Fluo-4 tiene implicaciones en la precisión de los modelos matemáticos que se pueden construir para simular las señales obtenidas con este indicador. Por ejemplo, las constantes τ_{on} y τ_{off} de la tasa de liberación de Ca^{2+} dependen del pico de Ca^{2+} que se obtenga para los transitorios de fluorescencia registrados con Mag-Fluo-4. De la misma manera, la magnitud de la liberación afecta la tasa de remoción que se debe incluir en el modelo para que el ajuste matemático sobre la señal experimental sea adecuado.

Conclusión

Los parámetros para la calibración de un indicador fluorescente varían considerablemente según la metodología empleada para determinarlos, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la viscosidad, la unión a proteínas, la presencia de otros iones (especialmente el Mg^{2+}), el instrumento de medición utilizado y su configuración, la concentración del indicador y el tipo de célula.

Estimar con precisión la concentración de Ca^{2+} libre citosólico en células musculares intactas mediante el indicador Mag-Fluo-4 solo será posible si se considera la contribución de cada uno de posibles artefactos que pueden alterar la señal del indicador y la medición de los parámetros necesarios para la calibración.

Bajo nuestras condiciones estandarizadas de investigación establecimos que las células tipo IIX de FDB tiene una autofluorescencia de $0,046 \pm 0,013$ U.A y el indicador Mag-Fluo-4 tiene *in situ* una F_{\min} corregida de $0,14 \pm 0,097$ U.A., una compartimentalización del $1,1 \pm 0,7$ %, una K_d de $118,9 \mu M$ y una F_{\max} corregida de $150,889 \pm 8,798$ U.A.. Utilizando en conjunto estos resultados y realizando un ajuste matemático logramos establecer que los transitorios de fluorescencia de Ca^{2+} de células tipo IIX de FDB tienen una concentración de Ca^{2+} basal de $171 \pm 0,008$ nM y un pico en la concentración de Ca^{2+} libre citoplasmático de $17,37 \pm 4,10 \mu M$ tras una sacudida simple.

Para realizar una estimación más precisa de las concentraciones de Ca^{2+} libre citoplasmático creemos importante aumentar el número de algunos experimentos, considerar las posibles interferencias en la señal ocasionadas por el Mg^{2+} libre y

establecer la fluorescencia de fondo producto de la fuga del indicador intracelular desesterificado.

Hasta donde conocemos esta es la primera investigación centrada en determinar las propiedades *in situ* del indicador Mag-Fluo-4 en células musculares intactas.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi tutor el doctor Juan Camilo Calderón Vélez por la constante asesoría, el tiempo invertido y la confianza en mi trabajo.

Al profesor Jaime Alberto Pérez Giraldo, Jefe del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, por el apoyo y por creer en la investigación en el área de Fisiología y Bioquímica.

A Óscar Andrés Rincón Cardeño por la contribución en los cálculos de la fracción de indicador unido a Ca^{2+} y Mg^{2+} y a Leidy Bibiana Arango Álzate por el apoyo en los experimentos.

Al Grupo de Investigación en Fisiología y Bioquímica-PHYSIS de la Universidad de Antioquia.

Al CODI y a la Oficina de Desarrollo Institucional de la Universidad de Antioquia por el financiamiento del proyecto.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Financiación

Convocatoria Programática Ciencias Exactas 2016. Proyecto CODI 2015-7858

Bibliografia

- Ackermann, M. A., Ziman, A. P., Strong, J., Zhang, Y., Hartford, A. K., Ward, C. W., ... & Bloch, R. J. (2011). Integrity of the network sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle requires small ankyrin 1. *J Cell Sci*, 124(21), 3619-3630.
- Andrade, F. H., Reid, M. B., & Westerblad, H. (2001). Contractile response of skeletal muscle to low peroxide concentrations: myofibrillar calcium sensitivity as a likely target for redox - modulation. *The FASEB journal*, 15(2), 309-311.
- Bar, A. & Pette, D. (1988). Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS letters*, 235(1-2), 153-155.
- Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Furukawa, T., & Peter, J. B. (1971). Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 220(2), 410-414.
- Barrige, M., Bootman, M., & Roderick, H. (2003). Calcium signaling: dynamics, homeostasis, and remodeling. *Nature*, 4, 517-529.
- Baylor, S. M., & Hollingworth, S. (2003). Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *The Journal of physiology*, 551(1), 125-138.
- Baylor, S. M., & Hollingworth, S. (2011). Calcium indicators and calcium signalling in skeletal muscle fibres during excitation-contraction coupling. *Progress in biophysics and molecular biology*, 105(3), 162-179.

- Bekoff, A., & Betz, W. J. (1977). Physiological properties of dissociated muscle fibres obtained from innervated and denervated adult rat muscle. *The Journal of physiology*, 271(1), 25-40.
- Bers, D. M. (2018). Excitation–Contraction Coupling. Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside. *Elsevier*, 7, 151-159.
- Bers, D. M., Patton, C. W., & Nuccitelli, R. (2010). A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers. *Methods in cell biology*, 99, 1-26.
- Bleunven, C., Treves, S., Jinyu, X., Leo, E., Ronjat, M., De Waard, M., ... & Zorzato, F. (2008). SRP-27 is a novel component of the supramolecular signalling complex involved in skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biochemical Journal*, 411(2), 343-349.
- Bolaños, P., Guillen, A., Rojas, H., Boncompagni, S., & Caputo, C. (2008). The use of CalciumOrange-5N as a specific marker of mitochondrial Ca²⁺ in mouse skeletal muscle fibers. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 455(4), 721-731.
- Bottinelli, R. & Reggiani, C. (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Progress in biophysics and molecular biology*, 73(2-4), 195-262.
- Brooke, M. H., & Kaiser, K. K. (1970). Three" myosin adenosine triphosphatase" systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18(9), 670-672.

- Burke, R. E., Levine, D. N., Zajac, F. E., Tsairis, P., & Engel, W. K. (1971). Mammalian motor units: physiological-histochemical correlation in three types in cat gastrocnemius. *Science*, 174(4010), 709-712.
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2010a). Myosin heavy chain isoform composition and Ca^{2+} transients in fibres from enzymatically dissociated murine soleus and extensor digitorum longus muscles. *The Journal of physiology* 588(1), 267-279.
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2010b). Ca^{2+} Transients and Myosin Heavy Chain (MHC) Composition in Murine Enzymatically Dissociated Fibers. *Biophysical Journal*, 98(3), 548a.
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2011). Kinetic changes in tetanic Ca^{2+} transients in enzymatically dissociated muscle fibres under repetitive stimulation. *The Journal of physiology*, 589(21), 5269-5283.
- Calderón, J. C., Bolaños, P., & Caputo, C. (2014). The excitation-contraction coupling mechanism in skeletal muscle. *Biophysical reviews*, 6(1), 133-160.
- Calderón, J. C., Bolaños, P., Torres, S. H., Rodríguez-Arroyo, G., & Caputo, C. (2009). Different fibre populations distinguished by their calcium transient characteristics in enzymatically dissociated murine flexor digitorum brevis and soleus muscles. *Journal of muscle research and cell motility*, 30(3-4), 125-137.
- Calderón, J. C., Raigosa, D., Giraldo, M., Bolaños, P., & Caputo, C. (2013). Calibration of Ca^{2+} transients obtained with the fast Ca^{2+} and Mg^{2+} dye Magfluor-4. *Biophysical Journal*, 104(2), 293a.

- Calderón-Vélez, J. C., & Figueroa-Gordon, L. C. (2009). El acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético: preguntas por responder a pesar de 50 años de estudio. *Biomédica*, 29(1), 140-160.
- Capote, J., Bolaños, P., Schuhmeier, R. P., Melzer, W., & Caputo, C. (2005). Calcium transients in developing mouse skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*, 564(2), 451-464.
- Caputo, C., & Bolaños, P. (1994). Fluo-3 signals associated with potassium contractures in single amphibian muscle fibres. *The Journal of physiology*, 481(1), 119-128.
- Caputo, C., Bolaños, P., & González, A. (2004). Inactivation of Ca²⁺ transients in amphibian and mammalian muscle fibres. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 25(4-5), 315-328.
- Cheung, A., Dantzig, J. A., Hollingworth, S., Baylor, S. M., Goldman, Y. E., Mitchison, T. J., & Straight, A. F. (2002). A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nature cell biology*, 4(1), 83.
- Close, R. I. (1972). Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*, 52(1), 129-197.
- Cobbold, P. H., & Rink, T. J. (1987). Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochemical Journal*, 248(2), 313.
- Cully, T. R., Edwards, J. N., & Launikonis, B. S. (2014). Activation and propagation of Ca²⁺ release from inside the sarcoplasmic reticulum network of mammalian skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 592(17), 3727-3746.

- Cully, T. R., Edwards, J. N., Friedrich, O., Stephenson, D. G., Murphy, R. M., & Launikonis, B. S. (2012). Changes in plasma membrane Ca-ATPase and stromal interacting molecule 1 expression levels for Ca²⁺ signaling in dystrophic mdx mouse muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 303(5), C567-C576.
- Cully, T. R., Edwards, J. N., Murphy, R. M., & Launikonis, B. S. (2016). A quantitative description of tubular system Ca²⁺ handling in fast-and slow-twitch muscle fibres. *The Journal of physiology*, 594(11), 2795-2810.
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., Konig, S., & Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *The Journal of cell biology*, 194(2), 335-346.
- Delbono, O., & Stefani, E. (1993). Calcium transients in single mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 463(1), 689-707.
- Dubowitz, V. & Pearse, A. E. (1960). Reciprocal relationship of phosphorylase and oxidative enzymes in skeletal muscle. *Nature*, 185(4714), 701.
- Ebashi, S. (1974). Regulatory mechanism of muscle contraction with special reference to the Ca²⁺-troponin-tropomyosin system. *Essays in Biochemistry*, 10, 1-36.
- Engel, W. K. (1962). The essentiality of histo-and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 12(11), 778-794.
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiological reviews*, 82(4), 893-922.

- Friedrich, O., & Head, S. I. (2017). Quantitative Ratiometric Ca^{2+} Imaging to Assess Cell Viability. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*, 171-193.
- González E. (2004). Alteraciones del acoplamiento excitación-contracción y la función del factor de crecimiento similar a la insulina-I en el deterioro del músculo esquelético con el envejecimiento. [Tesis doctoral]. San Vicente del Raspeig, Universidad de Alicante.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440-3450.
- Guth, L. & Samaha, F. J. (1969). Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Experimental neurology*, 25(1), 138-152.
- Harbig, K., Chance, B., Kovach, A & Reivich, M. (1976). In vivo measurement of pyridine nucleotide fluorescence from cat brain cortex. *Journal of applied physiology*, 41(4), 480-488.
- Hidalgo, C., Cifuentes, F., & Donoso, P. (1991). Sodium-Calcium Exchange in Transverse Tubule Vesicles Isolated from Amphibian Skeletal Muscles. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 639(1), 483-497.
- Hirota, A., Chandler, W. K., Southwick, P. L., & Waggoner, A. S. (1989). Calcium signals recorded from two new purpurate indicators inside frog cut twitch fibers. *The Journal of general physiology*, 94(4), 597-631.

- Hollingworth, S., Gee, K. R., & Baylor, S. M. (2009). Low-affinity Ca²⁺ indicators compared in measurements of skeletal muscle Ca²⁺ transients. *Biophysical journal*, 97(7), 1864-1872.
- Hollingworth, S., Zhao, M., & Baylor, S. M. (1996). The amplitude and time course of the myoplasmic free [Ca²⁺] transient in fast-twitch fibers of mouse muscle. *The Journal of General Physiology*, 108(5), 455-469
- Hu, Z., Yu, L., & Yu, Z. (2005). Theoretical analysis on ratiometric fluorescent indicators caused biased estimates of intracellular free calcium concentrations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 78(3), 179-187.
- Jacquemond, V. (1997). Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophysical journal*, 73(2), 920-928.
- Kao, J. P., Li, G., & Auston, D. A. (2010). Practical aspects of measuring intracellular calcium signals with fluorescent indicators. *Methods in cell biology*, 99, 113-152.
- Kerr, J. P., Ziman, A. P., Mueller, A. L., Muriel, J. M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J. D., ... & Bloch, R. J. (2013). Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(51), 20831-20836.
- Konishi, M., Hollingworth, S., Harkins, A. B., & Baylor, S. M. (1991). Myoplasmic calcium transients in intact frog skeletal muscle fibers monitored with the fluorescent indicator fura2. *The Journal of general physiology*, 97(2), 271-301.

- Konishi, M., Suda, N., & Kurihara, S. (1993). Fluorescence signals from the Mg^{2+}/Ca^{2+} indicator fura-2 in frog skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 64(1), 223.
- Lai, F. A., Erickson, H. P., Rousseau, E., Liu, Q. Y., & Meissner, G. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature*, 331, 315-319.
- Lamb, G. D. (1992). DHP receptors and excitation-contraction coupling. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 13(4), 394-405.
- Launikonis, B. S., & Stephenson, D. G. (1997). Effect of saponin treatment on the sarcoplasmic reticulum of rat, cane toad and crustacean (yabby) skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 504(2), 425-437.
- Li, N., Sul, J. Y., & Haydon, P. G. (2003). A calcium-induced calcium influx factor, nitric oxide, modulates the refilling of calcium stores in astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 23(32), 10302-10310.
- Ljubojević, S., Walther, S., Asgarzoei, M., Sedej, S., Pieske, B., & Kockskämper, J. (2011). In situ calibration of nucleoplasmic versus cytoplasmic Ca^{2+} concentration in adult cardiomyocytes. *Biophysical Journal*, 100(10), 2356-2366.
- López, R. J., Mosca, B., Treves, S., Maj, M., Bergamelli, L., Calderon, J. C., ... & Delbono, O. (2015). Raptor ablation in skeletal muscle decreases Cav1. 1 expression and affects the function of the excitation-contraction coupling supramolecular complex. *Biochemical Journal*, 466(1), 123-135.

- Lukyanenko, V., & Györke, S. (1999). Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves in saponin-permeabilized rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*, 521(3), 575-585.
- Olivera, J. F., & Pizarro, G. (2018). A study of the mechanisms of excitation-contraction coupling in frog skeletal muscle based on measurements of $[\text{Ca}^{2+}]$ transients inside the sarcoplasmic reticulum. *Journal of muscle research and cell motility*, 39(1-2), 41-60.
- Peter, J. B., Barnard, R. J., Edgerton, V. R., Gillespie, C. A., & Stempel, K. E. (1972). Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11(14), 2627-2633.
- Petr, M. J., & Wurster, R. D. (1997). Determination of in situ dissociation constant for Fura-2 and quantitation of background fluorescence in astrocyte cell line U373-MG. *Cell calcium*, 21(3), 233-240.
- Prosser, B. L., Wright, N. T., Hernandez O., Varney, K. M., Liu, Y., Olojo, R. O., ... & Schneider, M. F. (2008). S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptor and modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 5046-5057.
- Protasi, F. (2002). Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci*, 7(1-3), 650-658.
- Ridgway, E. & Ashley, C. (1967). Calcium transients in single muscle fibers. *Biochemical and biophysical research communications*, 29(2), 229-234.

- Ríos, E., Zhou, J., Brum, G., Launikonis, B. S., & Stern, M. D. (2008). Calcium-dependent inactivation terminates calcium release in skeletal muscle of amphibians. *The Journal of general physiology*, 131(4), 335-348.
- Sandow, A. (1952). Excitation-contraction coupling in muscular response. *The Yale journal of biology and medicine*, 25(3), 176-201.
- Schiaffino, S., Ausoni, S., Gorza, L., Saggin, L., Gundersen, K., & Lomo, T. (1988). Myosin heavy chain isoforms and velocity of shortening of type 2 skeletal muscle fibres. *Acta physiologica Scandinavica*, 134(4), 575-576.
- Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., ... & Lomo, T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, 10(3), 197-205.
- Schwaller, B. (2012). The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(8), 1294-1303.
- Shannon, T., & Bers, D. (1997). Assessment of intra-SR free [Ca²⁺] and buffering in rat heart. *Biophysical journal*, 73(3), 1524-1531.
- Shaw, M. A., Ostap, E. M., & Goldman, Y. E. (2003). Mechanism of inhibition of skeletal muscle actomyosin by N-benzyl-p-toluenesulfonamide. *Biochemistry*, 42(20), 6128-6135
- Staron, R. S. & Pette, D. (1993). The continuum of pure and hybrid myosin heavy chain-based fibre types in rat skeletal muscle. *Histochemistry*, 100(2), 149-153.

- Stein, J. M., & Padykula, H. A. (1962). Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat. *American Journal of Anatomy*, 110(2), 103-123.
- Stephenson, D. G., Lamb, G. D., & Stephenson, G. M. M. (1998). Events of the excitation-contraction-relaxation (E-C-R) cycle in fast-and slow-twitch mammalian muscle fibres relevant to muscle fatigue. *Acta physiologica Scandinavica*, 162(3), 229-245.
- Szentesi, P., Jacquemond, V., Kovacs, L., & Csernoch, L. (1997). Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology*, 505(2), 371-384.
- Tarpey, M. D., Amorese, A. J., Balestrieri, N. P., Ryan, T. E., Schmidt, C. A., McClung, J. M., & Spangenburg, E. E. (2018). Characterization and utilization of the flexor digitorum brevis for assessing skeletal muscle function. *Skeletal muscle*, 8(1), 14.
- Termin, A., Staron, R. S., & Pette, D. (1989). Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, 92(6), 453-457.
- Tojyo, Y., Tanimura, A., & Matsumoto, Y. (1997). Monitoring of Ca²⁺ release from intracellular stores in permeabilized rat parotid acinar cells using the fluorescent indicators Mag-fura-2 and calcium green C18. *Biochemical and biophysical research communications*, 240(1), 189-195.
- Toyoshima, C., & Mizutani, T. (2004). Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature*, 430, 529-535.

- Ward, K. M., & Wareham, A. C. (1985). Changes in membrane potential and potassium and sodium activities during postnatal development of mouse skeletal muscle. *Experimental neurology*, 89(3), 554-568.
- Wei, L., Varsányi, M., Dulhunty, A. F., & Beard, N. A. (2006). The conformation of calsequestrin determines its ability to regulate skeletal ryanodine receptors. *Biophysical journal*, 91(4), 1288-1301.
- Wei-LaPierre, L., Carrell, E. M., Boncompagni, S., Protasi, F., & Dirksen, R. T. (2013). Orai1-dependent calcium entry promotes skeletal muscle growth and limits fatigue. *Nature communications*, 4, 2805.
- Westerblad, H., & Allen, D. G. (1991). Changes of myoplasmic calcium concentration during fatigue in single mouse muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 98(3), 615-635.
- Williams, D. A., Head, S. I., Bakker, A. J., & Stephenson, D. G. (1990). Resting calcium concentrations in isolated skeletal muscle fibres of dystrophic mice. *The Journal of Physiology*, 428(1), 243-256.
- Zhou, J., Yi, J., Royer, L., Launikonis, B. S., González, A., García, J., & Ríos, E. (2006). A probable role of dihydropyridine receptors in repression of Ca²⁺ sparks demonstrated in cultured mammalian muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 290(2), C539-C553.
- Ziman, A. P., Ward, C. W., Rodney, G. G., Lederer, W. J., & Bloch, R. J. (2010). Quantitative measurement of Ca²⁺ in the sarcoplasmic reticulum lumen of mammalian skeletal muscle. *Biophysical journal*, 99(8), 2705-2714.