

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Angélica Rueda y Sánchez de la Vega
Correo E: aruedasan@prodigy.net.mx

Regulación de los receptores de rianodina cardiacos por moduladores endógenos y exógenos: el caso del Ca^{2+} y la cafeína

En el proceso de excitación-contracción en el músculo cardiaco participa activamente el canal de Ca^{2+} /receptor de rianodina (RyR), que al activarse permite el aumento de la concentración del Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) favoreciendo la contracción. La activación del receptor de rianodina ocurre cuando éste une a su ligando natural, el Ca^{2+} , mediante el fenómeno conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (1).

El receptor de rianodina es un homo-tetrámero que se encuentra asociado a la membrana del retículo sarcoplásmico. Se ha determinado que el lado citosólico del receptor tiene al menos 2 sitios de unión a Ca^{2+} : un sitio activador (de mayor afinidad) y otro inhibidor (de menor afinidad), de forma tal que cuando se grafica la actividad del receptor de rianodina en función de diferentes concentraciones de Ca libre (de pCa 9 a pCa 2) ésta tiene forma de campana, en donde la máxima activación se registra a concentraciones micromolares de Ca^{2+} (2). En algunas arritmias letales, como en la taquicardia ventricular polimórfica inducida por catecolaminas (o CPVT por sus siglas en inglés) se han encontrado mutaciones en el receptor de rianodina que tienen efectos profundos sobre su sensibilidad a Ca^{2+} . Específicamente la mutación puntual R4497C, modifica significativamente la afinidad del RyR por Ca^{2+} , en el sitio activador, de forma tal que el RyR ésta más activo a concentraciones de Ca^{2+} en el rango nanomolar (3). Esto funcionalmente se traduce en la aparición de liberaciones de Ca^{2+} anómalas que favorecen la aparición de extrasístoles y en consecuencia participan en el establecimiento de la arritmia.

En un problema anterior calculamos la afinidad del receptor de rianodina por $[\text{H}^3]$ -rianodina, así como el número total de receptores activos en una preparación microsomal de corazón de perro (REB 26(4): 142-143, 2007). Una forma sencilla para determinar el efecto de moduladores como el Ca^{2+} , sobre la actividad de estos receptores, es por ensayos de unión a ligando marcado radiactivamente (*binding*), en este caso, $[\text{H}^3]$ -rianodina, en presencia de diferentes concentraciones de sus moduladores.

Planteamiento experimental

Para determinar la sensibilidad de los receptores cardiacos de rianodina a Ca^{2+} se utilizó la fracción microsomal (100,000 x g) del homogenado de corazón de perro. En los tubos de unión total, (que se hacen por duplicado) se agregó la solución amortiguadora (pH = 7.2) con las diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre indicadas en la tabla 1, más $[\text{H}^3]$ -rianodina a una concentración fija de 7 nM. Se inició la interacción receptor-ligando al agregar 50 μg de proteína microsomal y se incubó por 90 min a 36 °C, para alcanzar el equilibrio. Posteriormente se filtró, se lavó y se midió la cantidad de $[\text{H}^3]$ -rianodina que permaneció unida a los microsomas usando el contador de centelleo líquido.

En los tubos de unión inespecífica (que también se hacen por duplicado) se agregó todo lo anterior, más ligando no marcado radiactivamente (10 μM de rianodina) y se procesó de la misma forma que los tubos en donde se determinó la unión total.

La tabla 1 muestra los datos de radioactividad (en cuentas por min, o cpm) que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como en los de unión no específica.

TABLA 1

[Ca ²⁺]-libre (μM)	Unión Total		Promedio dpm	Unión Específica	
	cpm Serie 1	cpm Serie 2		dpm	pmol/mg Pt
0.1	1028	1003			
1	1053	1095			
10	1454	1475			
100	1629	1579			
1000	1614	1657			
10000	1249	1177			
Unión no específica					
0.1	942	952			
1	939	910			
10	940	1000			
100	967	991			
1000	1053	1017			
10000	961	1007			

El receptor de rianodina es un blanco común para un gran número de factores endógenos (como Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP, ADP, calmodulina, sorcina, y otras proteínas) y exógenos (como rianodoles, metilxantinas, toxinas y anestésicos locales).

Las metilxantinas (dimetilxantina, teobromina, teofilina, cafeína, entre muchas otras) son componentes comunes en la dieta de la mayoría de las personas. Entre los diversos efectos fisiológicos de las metilxantinas se ha encontrado que evocan la salida de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares al incrementar la sensibilidad del RyR por su agonista endógeno. Dentro de las metilxantinas, la cafeína es la que se usa con mayor frecuencia para activar masivamente a los RyRs y determinar el contenido de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. La cafeína ofrece varias ventajas: es hidrosoluble, difunde rápidamente a través de la membrana plasmática y su unión al RyR es muy rápida y reversible.

En otro experimento se determinó el efecto de la cafeína (5 mM) sobre la actividad del RyR a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre. Los tubos se procesaron de la misma forma descrita anteriormente.

La tabla 2 muestra los datos de radioactividad que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como en los de unión inespecífica, en presencia de 5 mM de cafeína.

TABLA 2

Unión Total			Unión Específica		
[Ca^{2+}]-libre (μM)	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio dpm	dpm	pmol/mg Pt
0.1	1199	1112			
1	1753	1909			
10	2226	2349			
100	2176	2270			
1000	2080	1913			
10000	1769	1573			
Unión no específica					
0.1	954	967			
1	974	1000			
10	1009	968			
100	1049	955			
1000	927	1014			
10000	1174	1127			

PREGUNTAS

- Haga el promedio de cada punto, tanto para la *unión total* como para la *unión no específica*, en ambas tablas de datos. Convierta el promedio de cpm a desintegraciones por minuto (dpm) sabiendo que se usó un contador de centelleo líquido que tiene una eficiencia del 55 % y tiene una basal de radiactividad de 20 cpm. Calcule la *unión específica* en dpm.
- Si un Curie (Ci) es igual a 2.2×10^{12} dpm, calcule la *unión específica* en pmoles de [^3H]-rianodina/mg proteína, para cada uno de los puntos en ambas tablas, considerando que la [^3H]-rianodina tiene una actividad específica de 56 Ci/mmol.
- Haga las gráficas de regulación de la actividad de los RyRs por Ca^{2+} , en ausencia y presencia de cafeína (unión específica en pmol/ mg proteína vs. [Ca^{2+}] libre en μM); así como el ajuste correspondiente de los datos. ¿Cual es el efecto del Ca^{2+} sobre la actividad de los RyR?, ¿Cuál es el efecto de la cafeína sobre la actividad del RyR?
- Haga las graficas normalizadas, considerando como el 100 % el punto en que se encontró la mayor unión específica. Determine: (a) la concentración de Ca^{2+} en la cual se alcanza la mayor actividad del RyR (*Bmax*), (b) la constante de activación (*Ka*); (c) el coeficiente de Hill de activación (n_a); (d) la constante de inactivación (*Ki*); (e) el coeficiente de Hill de inactivación (n_i)

REFERENCIAS

- Bers DM (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
- Meissner G (2004). Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium* 35: 621-628.
- Jiang D, Xiao B, Zhang L, Chen SRW (2002) Enhanced basal activity of a cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) mutant associated with ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res* 91: 218-225.