142 REB 26(4): 142-143, 2007

PROBLEMA BIOQUÍMICO

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

Caracterización de los receptores cardíacos de rianodina por ensayo de unión a ligando marcado radiactivamente

Durante el proceso de excitación-contracción en el músculo cardiaco, el aumento en la concentración del calcio libre intracelular ([Ca²⁺]i) activa a la maquinaria contráctil de los cardiomiocitos. La fuente principal de calcio para la contracción se encuentra en los depósitos intracelulares, localizados en el retículo sarcoplásmico. La salida de calcio de estos depósitos se da por la vía de la activación del canal/receptor de rianodina, por un influjo de este mismo catión del medio extracelular, en el proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio. El receptor de rianodina recibió este nombre porque fue con la ayuda del alcaloide rianodina (que se extrae de la planta Ryania Speciosa) que este canal se identificó y localizó por primera vez en las cisternas terminales (regiones especializadas del retículo sarcoplásmico que están en proximidad con la membrana plasmática) del músculo esquelético (1). Sin embargo, es importante aclarar que en el corazón, el ligando natural del receptor de rianodina es el calcio.

En ciertas alteraciones cardiacas como en la taquicardia ventricular polimórfica (2) y en la insuficiencia cardiaca por diabetes (3) se han detectado cambios en el número de receptores funcionales de rianodina, o bien en la sensibilidad de éstos al calcio, y/o a algunos moduladores (ATP, Mg²+, FKBPs, sorcina). Mientras que en otras alteraciones, como en la insuficiencia cardiaca congestiva (4) no se han detectado estos cambios que comprometen la función normal del corazón, por lo que se han buscado otras explicaciones.

Una forma sencilla para determinar la cantidad de receptores funcionales de rianodina, así como la sensibilidad de los mismos a moduladores, es por medio de ensayos de unión ("binding") a un ligando, marcado radiactivamente, en este caso la [3H]-rianodina.

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para realizar un ensayo de unión a [³H]-rianodina se utiliza la fracción microsomal (100,000 x g) del homogenado de corazón de perro. En los tubos de unión total, se agrega el medio de unión más [³H]-rianodina a las concentra-

ciones indicadas en la Tabla 1. Se inicia la interacción receptor-ligando con 50 µg de proteína microsomal y se deja incubar por 90 min a 36 °C, para alcanzar el equilibrio. Posteriormente se filtra, se lava y se mide la cantidad de [³H]-rianodina que permaneció unida a los microsomas usando el contador de centelleo líquido.

En los tubos de unión inespecífica se agrega todo lo anterior, más ligando no marcado (10 µM de rianodina) y se procesa 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 obtienen tanto de los tubos de unión total como en los de unión inespecífica.

Después de un ataque cardiaco agudo (infarto) la función del corazón queda comprometida; la parte que no sufre daño debe realizar un trabajo mayor para compen-

TABLA 1

Uni	Unión Específica					
[3H]-Rianodina	a cpm	cpm	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg Prot
(nM)	Serie 1	Serie 2				
0.6	251	265				
1.25	369	423				
2.5	688	523				
5	1027	873				
10	1418	1461				
20	1974	2283				
		Unión	inespecífi	ica		
0.6	63	82				
1.25	125	124				
2.5	224	212				
5	372	366				
10	827	706				
20	1459	1556				

sar la perdida. Esto conduce a un periodo de disminución del trabajo cardiaco (insuficiencia cardiaca) y a una compensación que se refleja en un aumento de la masa muscular del corazón *a posteriori* (insuficiencia cardiaca

congestiva). Los cardiomiocitos del corazón hipertrófico sufren una remodelación estructural y aumentan de tamaño; sin embargo, paradójicamente, la función no mejora. Esto se refleja en un corazón que sigue presentando una menor contractilidad y que genera una presión sistólica disminuida, entre otras anomalías. Entre las causas que pueden explicar la disminución de la función cardiaca del corazón hipertrófico tenemos: 1) que la cantidad de receptores de rianodina esté disminuida, por lo que el proceso de excitación-contracción queda comprometido; 2) que aunque se mantenga el mismo número de receptores de rianodina, su modulación sea deficiente y 3) que la cantidad de calcio de los reservorios intracelulares sea baja e insuficiente para mantener la contracción. El primer planteamiento se puede contestar con un ensayo de unión a [3H]-rianodina. Este experimento se realiza con microsomas (100,000 x g) de corazón de perro al que previamente se le insertó un marcapasos para inducirle taquicardia y en consecuencia hipertrofia cardiaca (4) que equivale a la insuficiencia cardiaca congestiva en los humanos, con lo que se obtuvieron los datos que se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

Unión Total

Unión Específica

Union Iotai			Chion Especiate					
[3H]-Rianodina	cpm	cpm	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg Prot.		
(nM)	Serie 1	Serie 2						
0.6	205	226						
1.25	363	367						
2.5	640	548						
5	920	854						
10	1230	1167						
20	1920	1847						
Unión inespecífica								
0.6	58	66				_		
1.25	102	105						
2.5	165	160						
5	249	284						
10	499	547						
20	1083	1155						

PREGUNTAS

- La [³H]-rianodina que se usó tiene una actividad específica de 56 Ci/mmol y el frasco contiene 0.1 mCi/ml. Calcule la concentración molar de la [³H]-rianodina en el frasco.
- 2. Haga el promedio de cada punto, tanto para la unión total como para la unión inespecífica, 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.
- 3. Con los datos anteriores, y sabiendo que 1 Ci = 2.2 x 10¹² dpm, calcule la unión específica de [³H]-rianodina en pmol/mg de proteína, para cada uno de los puntos en ambas tablas de datos.
- 4. Haga las gráficas de saturación (unión específica en pmol/ mg proteína vs. [[³H]-rianodina] en nM) y el ajuste correspondiente de los datos de la Tabla 1 y Tabla 2. Determine la cantidad total de receptores de rianodina funcionales y la afinidad de los mismos por su ligando.
- 5. Qué les sucede a los receptores de rianodina que provienen de un corazón de perro al que se le indujo una insuficiencia cardiaca?
- 6. ¿Este tipo de interacción es cooperativa? Si o no, y por qué.

REFERENCIAS

- Fleischer S, Ogunbunmi EM, Dixon MC, Fleer EAM (1985) Localization of Ca²⁺ release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. PNAS 82: 7256-7259.
- Jiang D, Wang R, Xiao B, Kong H, Hunt DJ, Choi P, Zhang L, Chen SRW (2005) Enhanced Store Overload-Induced Ca²⁺ Release and channel sensitivity to luminal Ca²⁺ Activation Are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death Circ Res 97: 1173-1181.
- 3. Pereira L, Matthes J, Schuster I, Valdivia HH, Herzig S, Richard S, Gómez AM (2006) Mechanisms of [Ca²⁺]i Transient Decrease in Cardiomyopathy of db/db Type 2 Diabetic Mice. Diabetes 55:608-615.
- 4. Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH (2002) Abnormal calcium release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. Circ Res 91:1015-1022.