17

MONOGRAFIAS DR. ANTONIO ESTEVE

FARMACOLOGIA DE LOS CANALES IONICOS

A.G. García

17

MONOGRAFIAS DR. ANTONIO ESTEVE

FARMACOLOGIA DE LOS CANALES IONICOS

A.G. García

FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE

© 1995, Fundación Dr. Antonio Esteve
ISBN 84-605-2808-1
Depósito legal: B-21671-95
Coordinación y producción:
Ediciones Doyma, S.A.
Travesera de Gracia, 17-21/08021 Barcelona
Impreso en España por Gráficas Almogavares
Printed in Spain

La Fundación Dr. Antonio Esteve contempla como objetivo prioritario el estímulo del progreso de la terapéutica por medio de la comunicación y la discusión científica.
La Fundación quiere promover la cooperación internacional en la investigación farmacoterapéutica y, a tal fin, organiza reuniones internacionales multidisciplinarias donde grupos reducidos de investigadores discuten los resultados de sus trabajos.
Estas discusiones son recogidas en las publicaciones de los «Esteve Foundation Symposia».
Otras actividades de la Fundación Dr. Antonio Esteve incluyen la organización de reuniones dedicadas a la discusión de problemas de alcance más local, así como las conferencias periódicas «Dr. Antonio Esteve» y otras formas de apoyo a las ciencias médicas, farmacéuticas y biológicas.

Farmacología de los canales iónicos

A.G. García

Introducción 9

M. Criado, M. García-Guzmán, F. Sala, S. Sala y A. Campos-Caro

El receptor nicotínico de acetilcolina: estudios sobre el reconocimiento y ensamblaje de subunidades 11

J. Lerma, A.V. Paternain, N. Salvador, F. Somohano, M. Morales y M. Casado

Canales activados por glutamato 17

F. Barros, D. del Camino, L.A. Pardo y P. de la Peña

Canales de K^+ en la señal celular del calcio 27

B. Soria

Canales de potasio sensibles a ATP. Sulfonilureas y activadores de canales de potasio 37

J. López Barneo

Canales de potasio regulados por oxígeno 43

J. Tamargo

Canales de sodio sensibles a voltaje: implicaciones farmacoterapéuticas 53

C. González-García, R. Granja, J.M. Fernández, V. Izaguirre y V. Ceña

Posibilidades de manipulación farmacológica de los canales de potasio 63

L. Gandía, A. Albillos, M.G. López y B. Lara

Diversidad de canales de calcio voltajedependientes 69

J. García-Sancho

Canales de calcio sensibles a segundos mensajeros 79

C. Sunkel, M. Fau de Casa-Juana, L. Santos, M.M. Gómez, J. Priego, M.P. Ortega y A. García

Relación estructura química-actividad farmacológica de los moduladores de los canales de calcio 87

A.G. García, A. Albillos, L. Gandía, B. Lara, M.G. López y M. Villarroya

La señal celular del calcio: implicaciones fisiológicas y farmacoterápicas 95

Relación de participantes

A. ALBILLOS
Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

F. BARROS
Departamento de Biología Funcional
Área de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
Julián Clavería, s/n
33006 Oviedo

J. BIGORRA
Departamento de Investigación
y Desarrollo
Química Farmacéutica Bayer, S.A.
Calabria, 268
08029 Barcelona

W. BUÑO
Instituto Cajal
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Avda. Dr. Arce, 37
28002 Madrid

V. CEÑA
Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Universidad de Alicante
Campus de San Juan
Apdo. 374
03080 Alicante

M. CRIADO
Departamento de Neuroquímica
Universidad de Alicante
Campus de San Juan
Apdo. 374
03080 Alicante

E. DEL POZO
Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad de Granada
Avda. de Madrid, s/n
18012 Granada

S. ERILL

Fundación Dr. Antonio Esteve
Llobet i Vall-Llosera, 2
08032 Barcelona

J.E. ESQUERDA

Departamento de Ciencias Básicas Médicas
Universidad de Lérida
Avda. Alcalde Rovira Roure, 44
25196 Lérida

L. GANDÍA

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

A.G. GARCÍA

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

M. GARCÍA-LÓPEZ

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

J. GARCÍA-SANCHO

Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular y Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Valladolid
47005 Valladolid

R. GILABERT

Laboratorio de Neurofisiología
Facultad de Medicina
Avda. Diagonal, 643
08028 Barcelona

C. GONZÁLEZ

Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular y Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Valladolid
47005 Valladolid

A. GUAL

Laboratorio de Neurofisiología
Facultad de Medicina
Avda. Diagonal, 643
08028 Barcelona

X. GUITART

Departamento de Farmacología
Sistema Nervioso Central
Laboratorios Dr. Esteve, S.A.
Avda. Virgen de
Montserrat, 221
08041 Barcelona

M. HURLÉ

Departamento de Farmacología
y Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria
Cardenal Herrera Oria, s/n
39011 Santander

J. LERMA

Departamento de Plasticidad
Neuronal
Instituto Cajal
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Avda. Dr. Arce, 37
28002 Madrid

J. LÓPEZ BARNEO

Departamento de Fisiología:
Fisiología Médica y Biofísica
Facultad de Medicina
Universidad de Sevilla
Avda. Sánchez Pizjuán, 4
41009 Sevilla

J. MARSAL

Departamento de Biología
Celular
y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona
Casanova, 143
08036 Barcelona

C. MONTIEL

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

F. SALA

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Universidad de Alicante
Campus de San Juan
Apdo. 374
03080 Alicante

P. SÁNCHEZ-GARCÍA

Departamento de Farmacología
y Terapéutica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma
Arzobispo Morcillo, s/n
28029 Madrid

B. SORIA

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad de Alicante
Campus de San Juan
Apdo. 374
03080 Alicante

C. SUNKEL

Departamento de Investigación
Laboratorios Alter
Mateo Inurria, 30
28016 Madrid

J. TAMARGO

Instituto de Farmacología
y Toxicología
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Universidad Complutense de
Madrid
Facultad de Medicina
28040 Madrid

M. VALDEOLMILLOS

Departamento de Fisiología
Instituto de Neurociencias
Universidad de Alicante
Campus de San Juan
Apdo. 374
03080 Alicante

C. VALENZUELA

Departamento de Farmacología
Instituto de Farmacología
y Toxicología
Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Universidad Complutense
28040 Madrid

Introducción

En el otoño de 1993, el Prof. Sergio Erill, director de la Fundación Dr. Antonio Esteve, me sugirió la idea de organizar una reunión de trabajo sobre la «Farmacología de los canales iónicos». La reunión vio la luz en la primavera barcelonesa de 1994. Fruto de las 11 ponencias y de las discusiones que siguieron a cada una de este nuevo libro de la ya amplia colección *Monografías Dr. Antonio Esteve*.

La temática de canales iónicos es amplísima. Esta explosión de conocimientos se debe al desarrollo de dos poderosas herramientas metodológicas, las técnicas de *patch-clamp* y las de genética molecular. La diversidad de canales iónicos, además, ha podido enriquecerse con la aportación de herramientas farmacológicas, fundamentalmente en forma de toxinas procedentes de caracoles marinos, arañas, abejas, alacranes, serpientes y plantas, capaces de reconocer selectivamente canales de sodio (tetrodotoxina), de calcio (ω-conotoxina GVIA), o de potasio calcio-dependientes (apamina, charibdotoxina). Y, lo que es aún más importante, estas poderosas herramientas farmacológicas son capaces de identificar subtipos de canales para una misma especie iónica. Por ejemplo, en el caso de los canales de calcio neuronales, la ω-conotoxina IVA para los P, y la ω-conotoxina MIIVC para los Q.

Esta diversidad de canales iónicos constituye la base de la comunicación entre células de muy diversa estirpe, que se valen para ello de un lenguaje basado en la alternancia de señales eléctricas (potenciales de acción) y químicas (neurotransmisores, hormonas). Las posibilidades que existen para modificar farmacológicamente esta comunicación son, pues, enormes. Por ejemplo, los bloqueadores de calcio del subtipo L (nifedipino, verapamilo, diltiazem) ya tienen un puesto bien ganado en la farmacoterapia de la hipertensión o en la isquemia coronaria. Por otra parte, los inhibidores de canales de sodio (lidocaína, quinidina, lamotrigina) o del potasio (amiodarona) se utilizan como antiarrítmicos o antiepilépticos y los inhibidores de canales del potasio sensibles a ATP (glibenclamida) se explotan para tratar la diabetes. Sin embargo, existen todavía una pléyade de intervenciones farmacológicas por investigar, por ejemplo en cuanto a los subtipos de los canales de calcio o de potasio neuronales, cardíacos o vasculares, incluyendo activadores y bloqueadores de dichos canales.

La idea de la reunión de trabajo tenía por objetivo último perfilar esas posibilidades terapéuticas. Por ello, invitamos como ponentes a científicos implicados en química médica y en el desarrollo de nuevos fármacos (Carlos Sunkel), a biólogos moleculares (Manuel Criado), a bioquímicos (Javier García Sancho), fisiólogos (Juan Lerma y José López Barneo), biofísicos (Francisco Barros y Bernat Soria) y farmacólogos (Juan Tamargo, Valentín Ceña y Luis Gandía). También invitamos, hasta completar una larga treintena, a otros destacados especialistas bioquímicos, biólogos moleculares, fisiólogos, neurobiólogos, farmacólogos y farmacólogos clínicos a fin de que aportaran sus ideas y experiencias en los vivos y amplios debates que siguieron a cada ponencia. Estos debates fueron tan importantes e interesantes como las ponencias y por ello los hemos recogido aquí lo más escrupulosa y fidedignamente posible.

No están recogidos aquí ni todos los canales iónicos ni todos los científicos que en España trabajan este tema y que gozan de reconocimiento internacional. Teníamos que movernos dentro del generoso marco que nos ofreció la Fundación Dr. Antonio Esteve y no dio para más. La riqueza del tema y del número de investigadores españoles que lo estudian quizá permita plantear otras reuniones de trabajo en el futuro.

Esta monografía es el resultado de la colaboración de muchos. A ponentes y participantes quiero enviarles desde aquí mis más expresivas gracias por su generosa colaboración. Deseo destacar también la cuidadosa labor editorial de Juan Bigorra, especialmente en lo que se refiere a la transcripción de los debates, que tanto enriquecen nuestra actividad científica. Y, por último, pero no por ello menos importante, agradezco el sentido y orientación rigurosamente científicos que Sergio Erill, desde la Fundación Dr. Antonio Esteve, ha sabido dar a esta actividad tan importante para la comunicación entre los distintos especialistas que en España nos dedicamos al estudio de los canales iónicos, de su farmacología y de sus posibles perspectivas terapéuticas para la prevención, alivio o curación de las enfermedades del hombre.

A.G. García
Departamento de Farmacología
y Terapéutica.
Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

El receptor nicotínico de acetilcolina: estudios sobre el reconocimiento y ensamblaje de subunidades

M. Criado[a], M. García-Guzmán[a], F. Sala[b], S. Sala[c] y A. Campos-Caro[a]

Departamento de [a]Neuroquímica, [b]Farmacología y [c]Fisiología.
Instituto de Neurociencias. Universidad de Alicante.

Introducción

Los receptores asociados a canales iónicos constituyen una clase de proteínas de membrana esenciales en la transducción rápida de señales[1]. La propiedad que mejor define a este tipo de receptores es que el neurotransmisor controla la apertura del canal al unirse a un sitio del receptor. La estructura que caracteriza los receptores asociados a canales iónicos es la de un oligómero que forma un poro a través de la membrana (fig. 1). Existen diversos tipos de receptores, según el neurotransmisor que los activa: acetilcolina (tipo nicotínico), ácido γ-aminobutírico ($GABA_A$), glicocola, serotonina ($5\text{-}HT_3$) y glutamato (tipos NMDA y noNMDA[2,3]).

Gran parte de la información estructural y funcional que se posee sobre estos receptores se ha obtenido a partir del receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) presente en la unión neuromuscular y en el órgano eléctrico de algunos peces[4]. El AChR del músculo esquelético está constituido por 5 subunidades que atraviesan la membrana, denominadas α, β, y δ en una estequiometría $\alpha_2\beta\gamma\delta$. El AChR de tipo neuronal es también un pentámero pero formado de otras subunidades (subunidades con sitio de unión de agonistas α_2-α_6 y subunidades estructurales β_2-β_4)[5]. En cada subunidad se han detectado hasta 4 fragmentos hidrofóbicos que, plegados en forma de α-hélice, podrían atravesar la membrana (fig. 1). Aunque existen, al menos, 15 subunidades distintas, todas ellas poseen una estructura primaria homóloga y una organización estructural similar: un dominio extracelular que comprende la zona aminoterminal de cada subunidad, tres fragmentos transmembranales, una zona citoplásmica y un cuarto fragmento transmembranal con un corto segmento carboxiloterminal (fig. 1). Dentro de cada una de las áreas señaladas existen otros elementos a destacar:

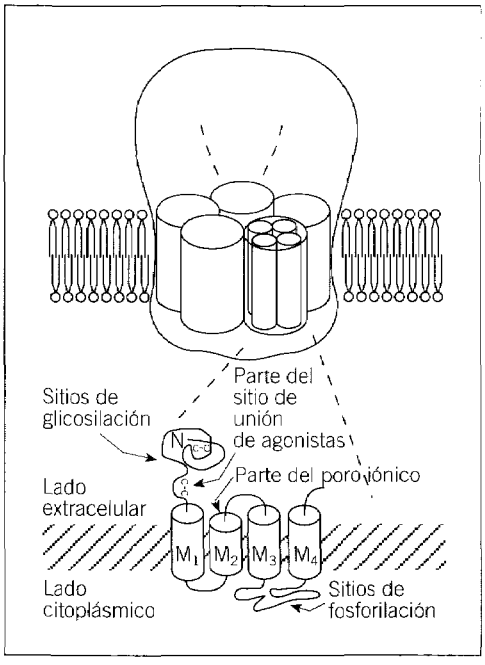

Fig. 1. Representación esquemática de la estructura de un receptor ionotrópico. En la parte superior de la figura puede observarse la organización estructural de un monómero de receptor formado por 5 subunidades. Todas las subunidades contribuyen de forma equivalente a la formación del monómero. Se cree que la sección más angosta del canal está formada por los fragmentos transmembranales de cada subunidad, que en la ilustración se indican como cilindros estrechos incluidos dentro de cilindros más anchos, que representan cada subunidad. En la parte inferior se resumen las principales características estructurales de cada subunidad, haciendo especial referencia a la subunidad α, que es la que contiene el sitio de unión de agonistas y a los fragmentos transmembranables M_1-M_4.

1) en el dominio extracelular un par de cisteínas separadas por 15 residuos, que forman un puente disulfuro, y que se consideran un signo estructural típico de los receptores ionotrópicos. También se ha localizado en la zona extracelular el sitio de unión de agonistas; *2)* dentro de los segmentos transmembranales, el segundo de ellos, que es el más polar, parece estar directamente implicado en la formación del poro iónico. A la entrada del mismo hay aminoácidos cargados negativamente, y *3)* en la zona citoplásmica, la más variable entre las distintas subunidades, existen sitios de fosforilación específicos para diversas cinasas[6].

Dado el gran número de subunidades que se han caracterizado hasta el momento, las posibles combinaciones que pueden obtenerse son muy numerosas. Averiguar cuáles son las combinaciones que producen receptores in vivo y qué mecanismos determinan la formación de determinadas combinaciones, su función y su localización son retos que la investigación sobre receptores ionotrópicos tiene planteados en la actualidad.

Modelo experimental

Las subunidades del receptor nicotínico neuronal denominadas α_3 y α_7 se expresan en la célula cromafín de la médula adrenal, formando parte, cada una de ellas, de un diferente subtipo de receptor. Esto implica que cada subunidad debe poseer dominios de reconocimiento específico que determinen qué subtipo de receptor han de formar. De hecho, estas subunidades, que han sido clonadas y secuenciadas en nuestro laboratorio[7,8], tienen distintos requerimientos de ensamblaje al ser expresadas en sistemas heterólogos, como es el oocito de *Xenopus*. Así pues, mientras que la subunidad α_3 necesita ensamblarse con subunidades estructurales para producir un receptor funcional, la subunidad α_7 es capaz, por sí sola, de producir receptores homoméricos. Hemos aprovechado este comportamiento diferente, que puede ser el reflejo de la existencia de esos dominios de reconocimiento que anteriormente se mencionaban, para diseñar un sistema modelo que permita abordar el estudio de los mismos. Dicho sistema consistió en la construcción de subunidades quiméricas α_3/α_7 y su posterior expresión en oocitos, examinando su capacidad de generar receptores homoméricos. El ensamblaje de homómeros funcionales se siguió midiendo la fijación de α-bungarotoxina (α-Bgt) a la membrana externa de los oocitos y las corrientes producidas al activar los receptores con nicotina. De esta forma, sería posible detectar receptores adecuadamente ensamblados que han seguido un proceso de maduración correcto desde el retículo endoplásmico a la membrana plasmática. Por el contrario, las subunidades mal ensambladas serían retenidas intracelularmente y degradadas[9].

Para la construcción de las quimeras α_3/α_7 se seleccionaron varios dominios estructurales (véase esquema de la subunidad α_7 en la fig. 2) que se describen a continuación. El primer dominio (dominio 0) estaba constituido por el péptido señal de la subunidad α_7 y una pequeña zona de la región 5' no codificante de la misma subunidad. Todas las quimeras contienen dicho dominio, de forma que un posible efecto en la expresión debido al mismo sería idéntico para todas ellas y no afectaría el resultado final. Esta precaución fue tomada debido a que en otros casos se ha observado que la región 5' no codificante y/o el péptido señal pueden influir en los niveles de expresión. El dominio 1 comprendía los primeros 126 aminoácidos de cada subunidad, llegando justo hasta un puente disulfuro, sin incluirlo, que está presente en todas las subunidades de todos los receptores ionotrópicos caracterizados hasta el momento. El dominio 2 se extendía desde este puente disulfuro hasta el aminoácido 205, justo antes del primer segmento transmembranal M_1. El dominio 3 comprendía el segmento M_1 y la pequeña zona hidrofílica que lo conecta al segmento M_2. Por último, la región del carboxilo terminal, incluyendo la zona citoplasmática variable y el fragmento hidrofóbico M_4, constituyó el dominio 4 (fig. 2).

Resultados

Previamente otros grupos han demostrado que la región N-terminal hidrofílica de los receptores ionotrópicos es responsable del reconocimiento entre subunidades[10,11] y de la formación de homómeros[12]. Por tanto, comenzamos nuestro análisis con una quimera que era totalmente α_3, excepto por el dominio 0 de α_7, y posteriormente incluimos gradualmente en la misma los dominios correspondientes a la subunidad α_7. Como era de esperar, la subunidad α_3 por sí sola era incapaz de producir receptores homoméricos (fig. 2, construcción C1), mientras que la subunidad α_7 sí que producía receptores capaces de unir α-Bgt y activarse al añadirles nicotina. Como puede observarse en la figura 2, los valores obtenidos con la subunidad α_7 son considerados como referencia para

todos los demás. La inclusión del dominio 1 no supuso una mejora en la expresión (fig. 2, construcción C2). Hay que indicar que el sitio de fijación de α-Bgt se ha localizado en el dominio 2 de la subunidad α_7, y al tener las quimeras C1 y C2 el dominio correspondiente de la subunidad α_3, que no tiene capacidad de unir la toxina, se esperaba que estas quimeras, incluso formando un receptor funcional, fueran incapaces de presentar fijación de α-Bgt, como así sucedió. Sin embargo, en caso de expresar un receptor funcional deberían producir corrientes, y esto tampoco ocurrió. Al extender al dominio 2 la secuencia de la subunidad α_7 (fig. 2, construcción C3) se pudieron detectar receptores, tanto de fijación de α-Bgt como de corrientes activadas por ligandos colinérgicos. No obstante, el nivel de expresión de receptores funcionales era bajo, lo que indica que hacían falta otros dominios para obtener un ensamblaje óptimo. Dado que la zona correspondiente a los fragmentos transmembranales está bastante conservada entre las distintas subunidades, se consideró la posibilidad de que los dominios necesarios podrían estar en la zona del carboxilo terminal, que como ya se ha indicado, es la más variable entre subunidades. Sin embargo, al incluir en la correspondiente quimera el dominio 4 de la subunidad α_7 (fig. 2, construcción C4) no se obtuvo mayor nivel de expresión. Este resultado nos indujo a analizar la zona correspondiente a los segmentos transmembranales, y comenzamos añadiendo el primer segmento M_1 (dominio 3, fig 2, construcción C5). La expresión de receptores se incrementó espectacularmente, por encima incluso de la obtenida con la subunidad α_7. Esta subunidad quimérica resultó muy interesante, ya que si bien era capaz de generar receptores que unían α-Bgt, estos no producían corrientes al activar con nicotina. El hecho de que esta quimera posea el fragmento M_1 de la subunidad α_7 y el M_2, considerado formador del poro, de la subunidad α_3, puede ser que provoque de alguna forma la interrupción de la necesaria comunicación entre el sitio de fijación de agonistas y el mecanismo de apertura del canal. Por tanto, podía concluirse que el segmento hidrofóbico M_1 era indispensable para el ensamblaje de homómeros. Sin embargo, y dada la estrategia de selección de las quimeras que se utilizó, quedaba por contestar la siguiente pregunta: ¿ya que se ha comprobado que los dominios 1 y 2 no son suficientes para producir la homooligomerización, son estos, al menos, necesarios para la misma? o, en otras palabras, ¿es suficiente el fragmento

Quimera	Estructura	Fijación de α-Bgt (%)	Corriente (%)
α_7	Sac I, Nar I, 0, 1, 2, 3, 4, N, C, M1 M2 M3 M4	100 ± 10	100 ± 17
C1	-6 LHVSLQSDAEHR 6 péptido señal	1,2 ± 0,2	0
C2	121 PGIFKSSCKIDV 132 Sac I, puente disulfuro	2,7 ± 0,6	0
C3	200 PTVSIR RLPLFY 213 Nar I, M_1	13,4 ± 1,7	5,1 ± 1,6
C4	297 VHYRTP DGGKMP 306 M_3	11,0 ± 0,8	3,3 ± 1,1
C5	237 GEKISL CISVLL 250 M_2	200 ± 17	0
C6	121 PAIFKS SCYIDV 132 Sac I, puente disulfuro	3,2 ± 0,8	0
C7	202 YSLYIR RRTLYY 211 Nar I, M_1	2,3 ± 0,3	88,3 ± 15,1

Fig. 2. Estructuras de las quimeras α_3/α_7 construidas y resultados obtenidos con las mismas. En cada línea se indica el nombre de la correspondiente quimera, la estructura de la misma y los datos de fijación de α-Bgt y de corrientes iónicas obtenidos cuando el ARN correspondiente a cada subunidad se inyectó en oocitos de Xenopus. *La primera construcción es la subunidad α_7, que incluye los dominios estructurales (numerados 0 a 4) seleccionados para construir las diferentes quimeras y dos sitios de restricción* (SacI *y* NarI) *utilizados en dicha construcción. En cada quimera se indican sombreados los dominios correspondientes a la subunidad α_7, mientras que en blanco están los correspondientes a la subunidad α_3. También se indica a la derecha del esquema de cada construcción la secuencia de aminoácidos de la zona correspondiente a la unión α_3/α_7 de cada quimera, así como algunas características de la misma, que pueden ser de utilidad para facilitar su localización. También en este caso los aminoácidos sombreados pertenecen a la subunidad α_7 y los señalados en blanco a la α_3. La construcción de las quimeras se llevó a cabo aprovechando los sitios de restricción señalados que eran comunes a las dos subunidades* (SacI) *o se introdujeron por mutagénesis* (NarI), *y también por métodos publicados*[14].

M_1 para dirigir la formación de receptores homoméricos? Para ello construimos las quimeras C6 y C7, partiendo de la subunidad α_7, y sustituyendo dominios 1 y 2 por los correspondientes de la subunidad α_3. Al sustituir el domino 1 de la subunidad α_7 por el correspondiente de la subunidad α_3 (fig. 2, construcción C6) se observó que no había ensamblaje de receptores funcionales y, por tanto, este dominio era imprescindible. Por el contrario, el dominio 2 no parecía tan importante, porque al sustituirlo en la subunidad α_7 por su equivalente de la subunidad α_3 (fig. 2, construcción C7), se seguían expresando altos niveles de receptores funcionales, que se activaban por agonistas. Como se ha indicado anteriormente, sólo el dominio 2 de la subunidad α_7 contiene el sitio de unión de α-Bgt, y esta quimera poseía el correspondiente de la subunidad α_3, por lo que era de esperar que no fuera capaz de unir la toxina, como sucedió.

Conclusión

La expresión en una célula individual de diferentes subtipos de neurorreceptores formados por subunidades diferentes pero homólogas exige la existencia de mecanismos capaces de controlar la identificación y la interacción específicas de las subunidades que conformarán las distintas especies moleculares. Como abordaje inicial hacia la determinación de la contribución de los dominios específicos de reconocimiento entre subunidades hemos estudiado el comportamiento de proteínas quiméricas compuestas de subunidades que se caracterizan por requerimientos de ensamblaje diferentes. Nuestros resultados indican que existen dos dominios importantes en el reconocimiento de subunidades. El primero es la zona aminoterminal, cuya importancia ya había sido destacada por otros investigadores[10-12]. El otro dominio es el primer fragmento transmembranal, que hemos reconocido por primera vez como imprescindible. ¿Es posible postular una interacción alostérica entre estos dos dominios? El plegamiento de la cadena peptídica comienza en cuanto el dominio aminoterminal emerge de la bicapa lipídica una vez atravesada la membrana del retículo endoplásmico. El plegamiento inicial del dominio 1 podría conducir al plegamiento cooperativo del dominio 3, estableciéndose así un mecanismo de ensamblaje adecuado para producir la asociación homomérica. Este sistema de reconocimiento podría ser más general y trascender más allá de los receptores ionotrópicos. Recientemente se ha demostrado que el primer fragmento transmembranal de los canales de potasio dependientes de voltaje es esencial en procesos de ensamblaje de canales funcionales en asociación alostérica con un dominio aminoterminal[13].

Agradecimiento

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo del Ministerio de Educación y Ciencia (DGICYT, proyectos PM89-0020 y PB92-0346) y de la Comisión de la Comunidad Económica Europea (proyecto SC1*CT91-0666). M. García-Guzmán fue becario predoctoral del Ministerio de Educación y Ciencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jessel TM, Kandell ER. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. Cell 1993; 72: 1-30.
2. Barnard EA. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. Trends Biochem Sci 1992; 17: 368-374.
3. Cockcroft VB, Osguthorpe DJ, Barnard EA, Friday AE, Lunt GG. Ligand-gated ion channels. Homology and diversity. Mol Neurobiol 1992; 4: 129-169.
4. Changeux JP, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labeling and site directed mutagenesis. Quart Rev Biophys 1992; 25: 395-432.
5. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Annu Rev Neurosci 1993; 16: 403-443.
6. Betz H. Homology and analogy in transmembrane channel design: lessons from synaptic membrane proteins. Biochemistry 1990; 29: 3.591-3.599.
7. Criado M, Alamo L, Navarro A. Primary structure of an agonist bindings subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from bovine adrenal chromaffin cells. Neurochem Res 1992; 17: 281-287.
8. García-Guzmán M, Sala F, Sala S, Campos-Caro A, Stühmer W, Gutiérrez LM et al. α-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors of bovine chromaffin cells: molecular cloning, functional expression and alternative splicing of the α7 subunit. (enviado a publicación).
9. Herskowitz I. Inactivation of genes by dominant negative mutations. Nature 1987; 329: 219-222.
10. Yu XM, Hall ZW. Extracellular domains mediating ϵ subunit interactions of muscle acetylcholine receptor. Nature 1991; 352: 64-67.

11. Verral S, Hall ZW. The N-terminal domains of acetylcholine receptor subunits contain recognition signals for the initial steps of receptor assembly. Cell 1992; 68: 23-31.
12. Kuhse J, Laube B, Magalei D, Betz H. Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. Neuron 1993; 11: 1.049-1.056.
13. Babila T, Moscucci A, Wang H, Weaver FE, Koren G. Assembly of mammalian voltage-gated potassium channels: evidence for an important role of the first transmembrane segment. Neuron 1994; 12: 615-626.
14. Herlitze S, Koenen M. A general and rapid mutagenesis method using polymerase chain reaction. Gene 1990; 91: 143-147.

DISCUSIÓN

C. GONZÁLEZ: Querría preguntarle si en los cultivos de células cromafines bovinas ha observado alguna modificación en la densidad o en el número total de receptores y específicamente de los que ligan alfabungarotoxina, en tiempos sucesivos o en tiempos crecientes.

M. CRIADO: Esto no lo hemos estudiado, pero existen datos referidos a receptores neuronales que demuestran que si las células se cultivan en presencia de ligandos, ya sean agonistas o antagonistas, se produce una regulación que se da en unas tres veces más de sitios de unión de alfabungarotoxina.

P. SÁNCHEZ-GARCÍA: Clásicamente los farmacólogos hemos distinguido los receptores nicotínicos ganglionares, los receptores nicotínicos neuromusculares y los receptores nicotínicos en el sistema nervioso central. ¿Los nicotínicos ganglionares son idénticos a los receptores ubicados en el sistema nervioso central?

M. CRIADO: Actualmente se está comprobando que los distintos receptores nicotínicos difieren en sus subunidades componentes. Por ejemplo, en el sistema nervioso central, la composición más común es α_4-β_2, es decir, las unidades α_4 con las unidades β_2 forman un pentámero, son receptores presinápticos. En los receptores ganglionares del sistema nervioso periférico, por ejemplo de la célula cromafín, la composición de subunidades difiere. Estamos estudiando la célula cromafín, y hemos encontrado que no contiene unidades α_2 ni α_4 sino que es α_3 la subunidad que une agonistas y también hemos detectado la subunidad β_4. Hay otra subunidad que es la subunidad α_5, que no sabemos si también forma parte o no de estos receptores. Ello explica las diferencias de los receptores en cuanto a las propiedades electrofisiológicas, y también en cuanto a sensibilidad de agonistas.

C. MONTIEL: ¿Existen diferencias funcionales entre los receptores que fijan alfabungarotoxina y los que no la fijan?

M. CRIADO: Sí, existen también diferencias funcionales, por ejemplo, la capacidad de desensibilización es distinta. Los receptores α_7, por ejemplo, se desensibilizan rápidamente y además al estudiar las secuencias desde el punto de vista evolutivo se observa que se desarrollaron divergencias bastante pronto durante la evolución.

J. MARSAL: Quisiera añadir alguna información complementaria a lo expuesto por el Dr. Criado. Usted se ha referido al hecho de inyectar mensajeros en el oocito y seguidamente comprobar su expresión en la membrana del mismo. También es posible inyectar membranas originales de, por ejemplo, un órgano eléctrico, y estas membranas se incorporan a la membrana del oocito, y lo hacen de manera funcional, es decir, que añadiendo acetilcolina dan unas corrientes que pueden llegar a 3 o 4 μA.

M. CRIADO: Es una información metodológica interesante.

A.G. GARCÍA: Querría hacer un comentario final, al hilo del título de esta mesa redonda, la farmacología de los canales iónicos. Aunque el receptor nicotínico del sistema nervioso central carece de una farmacología, de una farmacoterapia, se está trabajando activamente en ello. El problema de la adicción a la nicotina está despertando un interés inusitado, y creo que pronto podremos pensar en fármacos con aplicación terapéutica que actúen selectivamente en los receptores nicotínicos del sistema nervioso central, lo que probablemente se deba a estas estrategias de biología molecular que están identificando diferencias sutiles entre los receptores de la placa motora, del ganglio simpático y parasimpático y de la neurona.

Canales activados por glutamato

J. Lerma, A.V. Paternain, N. Salvador,
F. Somohano, M. Morales y M. Casado

Departamento de Plasticidad Neural. Instituto Cajal.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

Introducción

En el sistema nervioso central (SNC), la gran mayoría de las sinapsis excitadoras usan aminoácidos como sustancias neurotransmisoras. Los receptores que los aminoácidos excitadores reconocen en la célula postsináptica no sólo median la transmisión normal de la información a este nivel, sino que también participan en la maduración de las conexiones sinápticas y en el crecimiento y la estructuración celular[1,2], actuando estos aminoácidos en este punto como auténticos factores tróficos. Además, la activación de los receptores glutamatérgicos puede conllevar la generación de fenómenos plásticos largamente duraderos como ocurre con la variación por el uso de la eficacia sináptica, inducible prácticamente de por vida. Este fenómeno está considerado la base celular de los procesos de aprendizaje[3]. No obstante, la sobreexcitación de ciertos receptores puede también mediar la degeneración neuronal y provocar la muerte celular. Esto significa que los mismos mecanismos fisiológicos, activados inapropiadamente, son suficientes para desencadenar la muerte de elementos neuronales, pareciendo existir una frontera sutil entre la función normal y la patología.

En los últimos años ha tenido lugar un avance considerable en el entendimiento de las propiedades de los receptores que posibilitan la transducción de la información en esas vías excitadoras. En este sentido, parecen existir, al menos, dos grandes familias de receptores con propiedades farmacológicas y funcionales diferentes. Una de ellas comprende los receptores que forman un canal iónico (receptores ionotrópicos), definidos por la acción depolarizante de agonistas selectivos: N-metil-D-aspartato (NMDA) y α-amino-3-hydroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA), aunque el receptor de AMPA también puede ser activado por kainato*. Se ha podido determinar que ambos receptores pueden coexistir en la misma sinapsis[4,5]. Un nuevo tipo de receptor ionotrópico para el ácido glutámico es un receptor ionotrópico insensible a AMPA, que presenta desensibilización cuando se activa por kainato, quiscualato y glutamato. Este receptor ha sido descrito muy recientemente habiéndose denominado receptor «kainato-selectivo». La otra gran familia comprende receptores acoplados a proteína G, cuya activación provoca, en unos casos, la hidrólisis de fosfoinosítidos a IP3 y diacilglicerol[7] y, en otros, la modulación de los valores de cAMP[8,9]. Son los receptores de quiscualato tipo B o de ACPD (receptores metabotrópicos). Esta familia incluye lo que parece ser un autorreceptor de efecto inhibidor presináptico[10], el receptor de AP4, del que se dispone de limitada información. En un tema en continua evolución, esta clasificación puede verse alterada a medida que el conocimiento sobre los receptores nativos progrese, teniendo en cuenta las nociones aportadas en los últimos años por el estudio de los diferentes tipos de receptores recombinantes expresados en sistemas de expresión exógena.

Caracterización de los receptores glutamatérgicos

El subtipo NMDA de receptor glutamatérgico es un canal catiónico operado por ligando que permite la permeación de Na^+, K^+ y Ca^{2+} y que posee diversos lugares susceptibles de modulación tanto por agentes endógenos como

*Debido a la falta de especificidad farmacológica de los antagonistas disponibles hasta la fecha y a que estos receptores son también activados por kainato, los receptores de AMPA son comúnmente referidos como receptores de AMPA/kainato. La evidencia de que existen receptores de glutamato que, siendo activados por kainato de forma peculiar, no reconocen AMPA (véase posteriormente) obliga a hacer una distinción entre receptores de AMPA y receptores de kainato todavía no suficientemente universal. Por ello, en el presente artículo denominaremos receptores de AMPA a aquellos receptores que son activados por AMPA, aunque también lo sean por kainato[6].

exógenos. Estos lugares se corresponden con el sitio que reconoce al ligando endógeno, glutamato; un lugar de alta afinidad para glicina[11], que actúa *posibilitando* la apertura del canal inducida por el agonista[12,13] y que es diferente del receptor inhibidor de glicina, sensible a estricnina; un sitio o sitios dentro de la luz del canal, donde el Mg^{2+} y las fenciclidinas (PCP, ketamina, MK-801) se unen para producir el bloqueo del canal una vez abierto, fenómeno dependiente del potencial de membrana[14-17]. Un sitio adicional lo representa el lugar donde el Zn^{2+} actúa para inhibir alostéricamente la respuesta a NMDA[18,19]. Igualmente, se ha descrito la sensibilidad del receptor de NMDA a la concentración extracelular de H^{+}[20,21], así como al estado redox celular[22]. Más recientemente, se ha descrito la existencia de un lugar donde las poliaminas endógenas espermina y espermidina se unirían para potenciar la respuesta a NMDA[23]. Experimentos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que esta potenciación se debe a un decremento del grado de desensibilización del receptor de NMDA y que las poliaminas reconocen un lugar situado en la cara extracelular del receptor[24].

Los experimentos llevados a cabo durante los últimos años con técnicas de biología molecular han conducido a la clonación de las subunidades que deben conformar in vivo los receptores para glutamato. Ello ha puesto de manifiesto la existencia de varias subfamilias de subunidades. Las múltiples combinaciones de estas subunidades en dosis todavía no conocidas darían lugar a la gran diversidad funcional que los receptores de glutamato presentan. En este sentido, es posible obtener receptores funcionales de NMDA con propiedades similares a las descritas con respuestas nativas por ensamblaje heteromérico de dos tipos de subunidades, la NR1[25] y cada una de las 4 subunidades NR2 (NR2A-D)[26]. La subunidad NR1 aparece en siete formas diferentes generadas por procesamiento diferencial de los ARN[27], otorgando cada una de ellas al heterómero propiedades farmacológicas peculiares. La subunidad NR1 es ubicua en el SNC mientras que las NR2 poseen un carácter modulador, dado que los receptores recombinantes de NMDA adquieren características funcionales diferentes de acuerdo a la subunidad NR2 que se ensamble con NR1[26,28]. Además, las subunidades NR2 presentan perfiles diferentes de expresión espacial y temporal en el desarrollo, generando diversidad funcional en las distintas poblaciones neuronales del SNC[28].

En términos de papel funcional, está ampliamente reconocido que los receptores de AMPA median la mayor parte de la transmisión sináptica excitadora de tipo rápido[29]. La familia de los receptores AMPA comprende 4 subunidades altamente homólogas (GluR1-4)[30]. Estudios farmacológicos y electrofisiológicos con receptores recombinantes de AMPA expresados en líneas celulares o en oocitos de *Xenopus* han demostrado que este receptor posee una alta afinidad por AMPA y que este análogo de glutamato desencadena respuestas similares a las registradas en células pertenecientes al SNC[31]. Igualmente, han demostrado que este receptor, y el canal iónico que forma, es activado por kainato generando respuestas no desensibilizantes. La falta de agonistas específicos hace dificultosa la distinción funcional con otros receptores, lo que ha llevado a cuestionar la existencia, por ejemplo, de receptores de kainato específicos y de AMPA específicos en el SNC.

Igualmente, se ha propuesto que las familias compuestas por KA1 y KA2 y por GluR5, GluR6 y GluR7 representan las subunidades de los receptores de kainato de alta afinidad[32-34] y que in vivo los distintos receptores podrían estar compuestos por estas subunidades asociadas de forma heteromérica. Sin embargo, y a pesar de algunas evidencias autorradiográficas y datos de unión de radioligandos[35], la demostración de la existencia de este tipo de receptores en forma funcional en membranas nativas ha sido ardua. No obstante, muy recientemente, nuestro laboratorio ha podido demostrar, utilizando técnicas de *patch-clamp* y perfusión rápida, que un alto porcentaje de neuronas hipocámpicas en cultivo expresan receptores de glutamato que son selectivos para kainato[6]. Estos receptores sufren una profunda y rápida desensibilización y, aunque son activados por glutamato, quiscualato y domoato, no son sensibles a AMPA. Estos resultados han provisto la primera evidencia acerca de la existencia en células nerviosas de receptores funcionales de este tipo, dando lugar a la pregunta de cuál es su función en el SNC.

Canales iónicos activados por glutamato

Quizás uno de los resultados más sorprendentes que la expresión y la caracterización de las distintas subunidades han proporcionado es la constatación de que el receptor de AMPA, en determinadas configuraciones, muestra una llamativa permeabilidad a Ca^{2+}[36,37]. Era universalmente aceptado que el incremento citoplasmá-

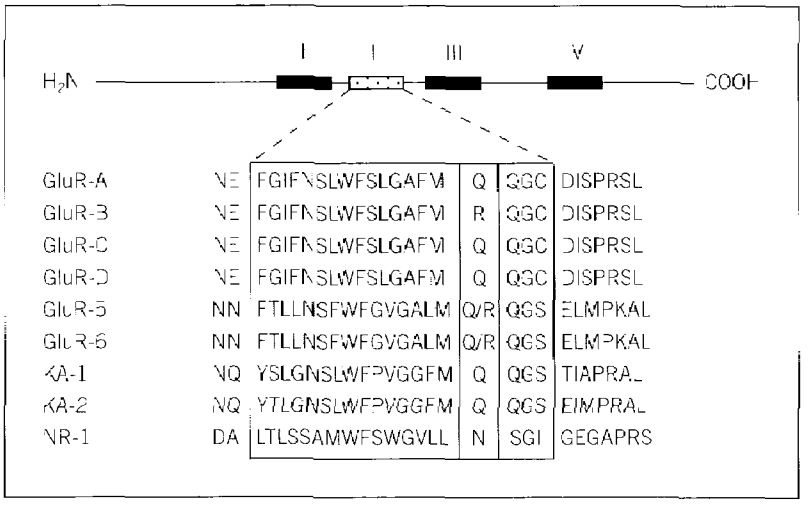

Fig. 1. Topología propuesta para las distintas subunidades de los receptores de glutamato. Parece que tanto el extremo amino como el carboxiterminal se encuentran localizados extracelularmente. Los rectángulos numerados I-IV representan los segmentos transmembrana, postulados a partir de estudios de hidrofobicidad. En la parte inferior se muestran alineadas las secuencias aminoacídicas correspondientes al segundo segmento transmembrana (zona sombreada) de varias subunidades. Se postula que este segmento forma parte de la pared del canal iónico. En algunas subunidades, como GluR-B, GluR-5 y GluR-6, el «sitio Q/R» presente en el segundo segmento transmembrana (sombreado claro) puede estar ocupado por glutamina (Q) o arginina (R) debido a fenómenos de editaje del ARNm. En cerebro de rata se ha comprobado que mientras que prácticamente el 100% del ARNm que codifica para GluR-B se encuentra editado (posee un codón para R), sólo el 30% del ARNm para GluR-5 presenta un codón editado, porcentaje que es aproximadamente del 75% en el caso de GluR-6[52]. En las subunidades del receptor de NMDA (NR-1, NR-2A, -2B, -2C y -2D) la posición homóloga al sitio Q/R está ocupada por una asparragina (N). Este sitio es crítico en todas las subunidades y determina en gran medida la permeabilidad iónica del canal.

tico de Ca^{2+} en respuesta a glutamato se debía a la apertura de receptores de NMDA, o a la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en respuesta a la despolarización que el glutamato provoca. Los estudios de biología molecular han demostrado que se pueden obtener diversos tipos de receptores funcionales de AMPA por combinaciones de las subunidades GluR-A, -B, -C y -D (también denominadas GluR1-4)[30,38] (fig. 1). La expresión de estas subunidades ha puesto de manifiesto que el Ca^{2+} puede permear aquellas formaciones homoméricas o heteroméricas que carecen en su composición de la subunidad GluR-B[35,37]. Otro hecho llamativo es que en ausencia de GluR-B, las corrientes mediadas por los receptores de AMPA presentan una marcada rectificación en dirección entrante. Por el contrario, receptores que poseen la subunidad GluR-B en su composición carecen de rectificación entrante y no presentan permeabilidad al Ca^{2+}[39]. Estos resultados indican que la presencia de GluR-B determina tanto el comportamiento voltaje-dependiente del heterómero como la permeabilidad al Ca^{2+} del canal funcional. Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que el responsable de este comportamiento es un único aminoácido situado en el segundo segmento transmembrana y que se origina por editaje del ARNm[39,40]. En la subunidad GluR-B, este residuo es arginina (R), mientras que en los GluR-A, -C y -D, este puesto está ocupado por glutamina (Q) (fig. 1). Este sitio, denominado «Q/R», es crítico en el funcionamiento de todos los canales operados por glutamato ya que en todas las subunidades de los receptores de NMDA el aminoácido presente en el lugar homólogo, una asparragina, controla igualmente la permeabilidad del canal al Ca^{2+} y el bloqueo por el Mg^{2+}[41].

Dada la importancia que la existencia o no de esta vía de entrada del Ca^{2+} a través de los receptores de AMPA puede tener en la función neuronal y lo que de ello se pudiera derivar en términos de participación en fenómenos plásticos y/o excitotóxicos, decidimos examinar la forma de las relaciones corriente-voltaje (I/V) y evaluar la permeabilidad al Ca^{2+} de los receptores de AMPA expresados por las células hipocámpicas en cultivo (fig. 2). Estos resultados se extendieron a neuronas hipocámpicas, disociadas agudamente a partir de individuos jóvenes, que

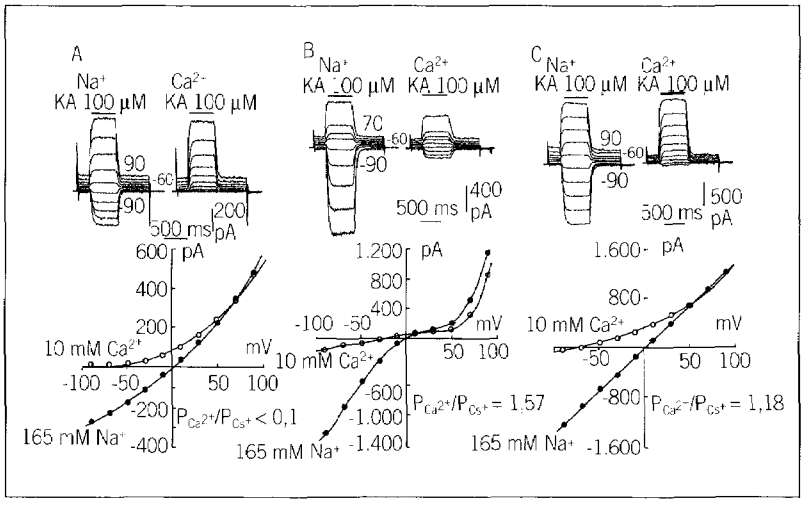

Fig. 2. Propiedades de las corrientes activadas por kainato actuando en los receptores de AMPA en neuronas hipocámpicas mantenidas en cultivo. En la parte superior de la figura (de A a C) se muestran las respuestas provocadas por perfusión rápida de kainato (KA) a varios potenciales de membrana cuando la solución extracelular contuvo Na^+ (registros rotulados Na^+) o cuando, en ausencia de Na^+, el Ca^+ fue el único ion responsable de la corriente entrante (registros rotulados Ca^{2+}). El protocolo seguido fue el siguiente: el potencial de membrana se varió desde -90 hasta +90 mV en pasos de 20 mV. El potencial de reposo entre pulsos fue de -60 mV. Se aplicó Kainato a concentración constante durante 0,6 s (barra horizontal) en cada valor de potencial. En la parte inferior de cada caso se muestra la relación I/V, calculada tras la sustracción de la corriente de pérdida correspondiente. Las líneas son polinomios de segundo (A y C) o cuarto (B) orden ajustados a los valores de amplitud. Las respuestas inducidas por kainato, actuando sobre los receptores de AMPA, pueden ser clasificadas en rectificadoras en sentido saliente y no permeables a Ca^{2+} (A), rectificadores en sentido entrante y permeables a Ca^{2+} (B) y aproximadamente lineales, con baja, aunque no despreciable, permeabilidad a Ca^{2+}. La razón de permeabilidad $P_{Ca^{2+}}$ / P_{Cs} calculadas según la ecuación de campo constante, está indicada en cada célula. Tomada de Lerma et al[42].

al conservar la polaridad estructural nos permitieron estudiar la distribución topológica de los receptores en el eje somatodendrítico. Los receptores de AMPA se activaron con kainato, puesto que este agonista no desensibiliza dichos receptores, permitiendo estudiar las corrientes en condiciones estacionarias. Con este estudio[42] se demostró que, aunque la mayoría (52,2%) de las células en cultivo expresan receptores de AMPA que carecen de permeabilidad a Ca^{2+} (fig. 2A), existe un número significativo de neuronas en las que la activación de estos receptores puede conllevar una entrada de Ca^{2+} muy sustancial. De este último grupo hay que distinguir un pequeño porcentaje (6,6%) que presentan respuestas a kainato con una clara permeabilidad al Ca^{2+} (P_{Ca2+}/ P_{Cs+} =0,9) (fig. 2B). No obstante, no se encontraron permeabilidades al Ca^{2+} tan altas como las descritas para receptores de AMPA recombinantes y, en todo caso, fueron menores que las estimadas en las mismas condiciones para los receptores de NMDA (P_{Ca2+}/P_{Cs+} =5,8). Las células que mostraron mayor permeabilidad al Ca^{2+} presentaron una relación I/V con rectificación entrante, aunque no completa. El 41% de las células estudiadas presentaron una curva I/V aproximadamente lineal y una permeabilidad al Ca^{2+} baja, aunque no despreciable (P_{Ca2+}/ P_{Cs+} =0,18) (fig. 2C). En todo caso, se pudo comprobar la existencia de una correlación entre el grado de rectificación entrante y el grado de permeabilidad al Ca^{2+}.

Esto lleva a la conclusión de que las células hipocámpicas deben expresar los dos tipos de receptor de AMPA con propiedades de rectificación opuestas y, por consiguiente, con baja y alta permeabilidad al Ca^{2+}. Ello haría posible la existencia de rectificación incompleta en las curvas I/V, así como una permeabilidad al Ca^{2+} graduada a nivel celular a través de los receptores de AMPA.

Aunque la existencia de subunidades de receptores de AMPA aún desconocidas no se puede descartar, esta última conclusión es especialmente atractiva puesto que implica que receptores de AMPA permeables y no permeables a Ca^{2+} (es decir, que contienen y que ca-

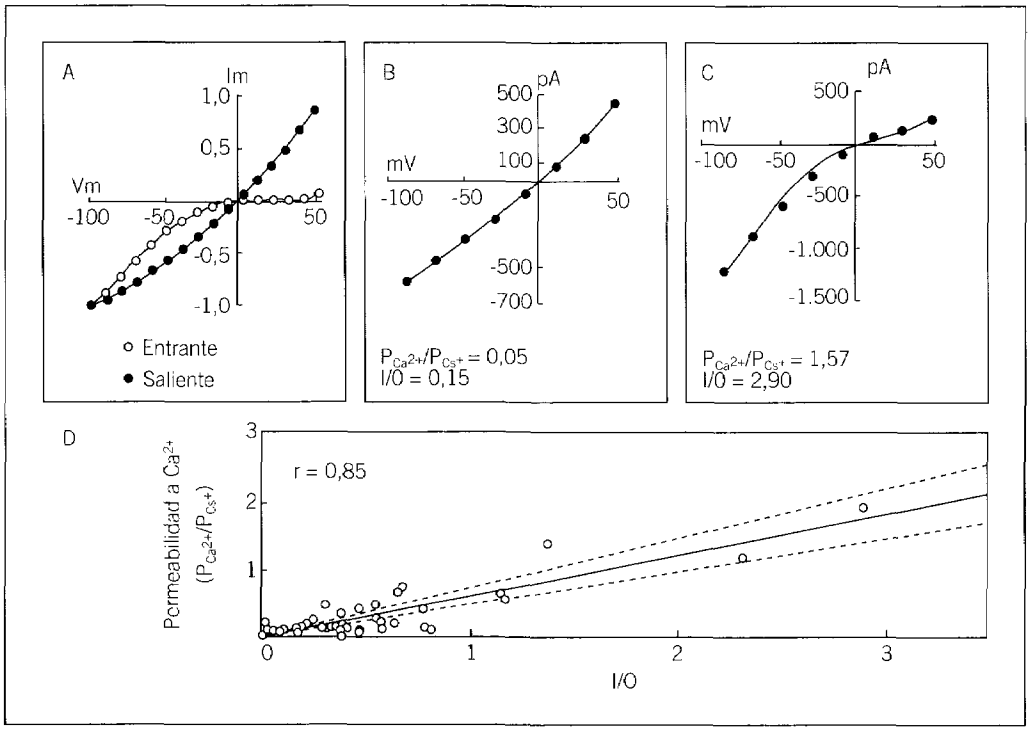

Fig. 3. Modelado de las relaciones I/V de los receptores de AMPA. A: relaciones I/V en 2 células prototípicas que muestran rectificación entrante (círculos) o saliente (triángulos). Los puntos representan los valores normalizados de corriente inducidos por kainato a cada valor de potencial de membrana. Las líneas representan un polinomio de cuarto grado (rectificación entrante) o de segundo grado (rectificación saliente) ajustado a los valores obtenidos en esas células. Estos polinomios fueron:

Entrante $= 8{,}795 \times 10^{-9} x^4 + 1{,}073 \times 10^{-6} x^3 - 7{,}157 \times 10^5 x^2 + 9{,}306 \times 10^{-4} x$
Saliente $= 4{,}867 \times 10^{-5} x^2 + 1{,}512 \times 10^{-2} x$

Los valores de corriente, obtenidos experimentalmente en 41 células que mostraban características mixtas, se ajustaron en cada caso con la función resultante de la suma de los polinomios indicados:

I•(Entrante)+O•(Saliente) + *offset*

donde I *y* O *representan las amplitudes de cada función polinómica, y fueron los únicos parámetros (más el* offset*) que dejaron fluctuar libremente durante el proceso de ajuste. B y C muestran resultados representativos de ajustes en 2 células de características muy distintas. Los puntos son datos experimentales; las líneas representan el resultado del ajuste. La razón de permeabilidad Ca^{2+}/Cs^+, así como la razón de las amplitudes de cada polinomio (I/O), están indicadas en cada caso. D: correlación entre la razón de los componentes de entrada y salida estimados por ajuste y el grado de permeabilidad a Ca^{2+}, medido para cada una de las células (n=41). Se representan tanto la línea de regresión como el intervalo de confianza al 90% (líneas discontinuas). r es el coeficiente de correlación, que fue significativo al 99%. Tomado de Lerma et al*[42].

recen de GluR-B editada) coexisten en la misma célula en mayor o menor proporción. Para comprobar esta hipótesis se modeló la voltaje-dependencia de los receptores de AMPA permeables al Ca^{2+} mediante un polinomio de cuarto grado, que ajustó y representó perfectamente la curva I/V de las respuestas mediadas por los receptores de AMPA en una célula que presentó una fuerte rectificación entrante. Esta función, así calculada, se tomó como prototípica de los canales de AMPA permeables al Ca^{2+}. Un polinomio de segundo grado, ajustado a una relación I/V con cierta rectificación saliente, sirvió para representar adecuadamente la curvatura de la relación I/V que típicamente presentan los receptores no permeables al Ca^{2+} (fig. 3A). Si ambos tipos de receptor coexisten en la misma célula y si para cada valor

de Vm su activación contribuye igualmente a la corriente total, la relación I/V para esa célula podría ser calculada por la suma ponderada de las funciones que explican el comportamiento de cada tipo de receptor. Las figuras 3B y 3C exponen el resultado de ajustar la suma de los 2 polinomios, calculados previamente, a los puntos obtenidos experimentalmente en 2 casos extremos. Los únicos parámetros libres en el ajuste fueron las amplitudes de cada función polinómica. Como puede verse, con este modelo es posible explicar relaciones I/V muy dispares, considerando únicamente la presencia relativa de cada componente. Esta fue cuantificada como la razón entre las amplitudes estimadas que definieron el componente rectificador de entrada y el de salida. Una comprobación ulterior de este modelo podría venir dada por la existencia de correlación entre el grado de permeabilidad al Ca^{2+}, medido previamente en cada una de las células analizadas, con la razón de las amplitudes estimadas para cada componente siguiendo el modelo. Efectivamente, la razón de amplitudes de los respectivos polinomios estuvo bien correlacionada con el grado de permeabilidad al Ca^{2+}, medido como la razón de permeabilidades Ca^{2+}/Cs^{+} (fig. 3D). Este modelo tan simple demuestra que la rectificación graduada de las corrientes mediadas por activación de los receptores de AMPA es posible si receptores de uno y otro tipo son expresados por la misma célula. Igualmente, la existencia de poblaciones celulares que, teniendo una relación I/V lineal muestran una entrada sustancial de Ca^{2+} cuando se activan los receptores de AMPA, es posible. En este sentido, se han descrito acumulaciones relevantes de Ca^{2+} tras la activación de receptores de AMPA en células que presentaron una relación I/V prácticamente lineal[43-45]. De acuerdo a estas consideraciones, podemos afirmar que una permeabilidad celular relativamente baja al Ca^{2+} cuando se activan los receptores de AMPA no significa la existencia de receptores de AMPA parcialmente permeables al Ca^{2+}, sino que sólo unos pocos receptores de AMPA de los expresados por esa célula son permeables al Ca^{2+}.

La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores de AMPA puede tener un gran significado funcional, particularmente allí donde los receptores de NMDA estén pobremente representados. Se ha demostrado recientemente que sinapsis carentes de receptores de NMDA presentan receptores de AMPA capaces de pasar corriente sólo en dirección entrante (rectificadores)[46]. Estos receptores, como se acaba de argumentar, deben ser permeables al Ca^{2+}. Aunque el ARNm para la subunidad GluR-B se colocaliza con ARNm codificantes para otras subunidades en la mayoría de las células hipocámpicas[47], la coexistencia de receptores de AMPA permeables y no permeables a Ca^{2+} puede ser un fenómeno ampliamente extendido. Por ejemplo, las células de Purkinje muestran una entrada de Ca^{2+} sustancial por activación de los receptores de AMPA, a pesar de que expresan grandes cantidades de ARNm para GluR-B[48]. Aunque todavía no suficientemente valorado, las neuronas que expresen receptores de AMPA permeables al Ca^{2+} deben ser particularmente vulnerables a glutamato. Como la expresión de las diferentes subunidades que constituyen los receptores varía con el tiempo[49,50], el grado de susceptibilidad excitotóxica para diferentes poblaciones neuronales puede igualmente variar, ocasionando que ciertas áreas cerebrales sean más o menos susceptibles a los fenómenos excitotóxicos durante fases particulares del desarrollo.

Conclusiones

En resumen, los receptores para los aminoácidos excitadores, principalmente glutamato, no sólo median la transmisión sináptica normal, sino que también participan en diversos fenómenos fisiológicos e igualmente son los responsables de numerosos procesos neurodegenerativos. Por ello, el estudio de los receptores para los aminoácidos excitadores y el desarrollo de antagonistas que pudieran prevenir el daño excitotóxico es, en la actualidad, una de las áreas más activas de la neurobiología tanto básica como clínica. El conocimiento de la farmacología, la biofísica y los sitios de modulación de los receptores de glutamato es esencial para el desarrollo de fármacos específicamente dirigidos a influenciar y controlar su actividad, en la esperanza de que disminuyendo la estimulación excesiva y prolongada de los receptores de glutamato se atenuará la neurodegeneración que conllevan.

Agradecimiento

Los autores agradecen la ayuda de D. Guinea en la realización de estos trabajos, que han sido financiados por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (PB89-0061) y el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (92/0266). F. Somohano disfrutó de una beca posdoctoral de la CEE y A.V. Paternain disfruta de una beca Glaxo-CSIC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brewer GJ, Cotman CW. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. Neurosci Lett 1989; 99: 268-273.
2. Ranschecker JP, Hahn S. Ketamine-xylazine anaesthesia blocks consolidation of ocular dominance changes in kitten visual cortex. Nature 1987; 326: 183-185.
3. Nicoll RA, Kauer JA, Malenka RC. The current excitement in long-term potentiation. Neuron 1988; 1: 97-103.
4. Bekkers JM, Stevens CF. NMDA and non-NMDA receptors are colocalized at individual excitatory synapses in cutured rat hippocampus. Nature 1989; 341: 230-233.
5. Jones KA, Baughmann RW. Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. Neuron 1991; 7: 593-603.
6. Lerma J, Paternain AV, Naranjo JR, Mellström B. Functional kainate-selective glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11.688-11.692.
7. Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. Nature 1985; 317: 717-719.
8. Tanabe Y, Nomura A, Masu M, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Signal transduction, pharmacological properties, and expression patters of two rat metabotropic glutamate receptors. mGluR3 and mGluR4. J Neurosci 1993; 13: 1.372-1.378.
9. Prezeau L, Manzoni O, Hornburger V, Sladeczek F, Curry K, Bockaert J. Characterization of a metabotropic glutamate receptor: direct negative coupling to adenylyl cyclase and involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 8.040-8.044.
10. Forsythe IG, Westbrook GL. Slow excitatory postsynaptic currents mediated by NMDA receptor on cultured mouse central neurons. J Physiol 1988; 396: 515-534.
11. Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurones. Nature 1987; 325: 529-531.
12. Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in Xenopus oocytes. Science 1988; 241: 835-837.
13. Lerma J, Zukin RS, Bennett MVL. Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in Xenopus oocytes and is requiered for NMDA responses. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 2.354-2.358.
14. Huettner JE, Bean BP. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 1.307-1.311.
15. Lerma J, Zukin RS, Bennett MVL. Interaction of Mg^{2+} and phencyclidine in use-dependent block of NMDA channels. Neurosci Lett 1991; 123: 187-191.
16. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. Nature 1984; 309: 261-263.
17. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature 1984; 307: 462-465.
18. Christine CW, Choi DW. Effect of Zinc on NMDA receptor channel currents in cortical neurons. J Neurosci 1990; 10: 108-116.
19. Westbrock GL, Mayer ML. Micromolar concentrations of Zn^{2+} antagonize NMDA and GABA responses on hippocampal neurons. Nature 1987; 328: 640-643.
20. Tang CM, Dichter M, Morad M. Modulation of N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H^+. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 6.445-6.449.
21. Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. Nature 1990; 345: 347-350.
22. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. Neuron 1989; 2: 1.257-1.263.
23. Ransom RW, Stec NL. Cooperative modulation of [^{3}H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. J Neurochem 1988; 51: 830-836.
24. Lerma J. Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization. Neuron 1992; 8: 343-352.
25. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of rate NMDA receptors. Nature 1991; 354: 31-37.
26. Monyer H, Sprenger R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H et al. Heteromeric NMDA receotors: molecular and functional distintion of subtypes. Science 1992; 256: 1.217-1.221.
27. Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S. Structure and properties of 7 isoforms of the NMDA receptor generated by alternative spicing. Biochem Biophys Res Commun 1992; 185: 826-832.
28. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M et al. Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit. J Biol Chem 1993; 268: 2.836-2.843.
29. Gasic G, Heinemann S. Receptor coupled to ionic channels: the glutamate receptor family. Curr Opin Neurobiol 1991; 1: 20-26.
30. Keinanen K, Wisden W, Sommer B, Werener P, Herb A, Verdoorn TA et al. A family of AMPA-selective glutamate receptors. Science 1990; 249: 556-560.
31. Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH. A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. EMBO J 1992; 11: 1.651-1.656.
32. Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C et al. Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5:

expression in the nervous system during development. Neuron 1990; 5: 583-595.
33. Herb A, Burnashev N, Werner P, Sakmann B, Wisden W, Seeburg PH. The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expresion in brain and forms ion channels with distantly related subunits. Neuron 1992; 8: 775-785.
34. Sakimura K, Morita T, Kushiya E, Mishima M. Primary structure and expression of the $\gamma 2$ subunit of the glutamate receptor channel selective for kainate. Neuron 1992; 8: 267-274.
35. Young AB, Fagg GE. Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 126-133.
36. Hollman M, Hartley M, Heinemann SF. Ca^{2+} permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. Science 1991; 252: 851-853.
37. Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. Neuron 1992; 8: 189-198.
38. Hollman S, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann SF. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. Nature 1989; 342: 643-648.
39. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg P, Sakmann B. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. Science 1991; 252: 1.715-1.718.
40. Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF. Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. Science 1991; 253: 1.028-1.031.
41. Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M. Identification by mutagenesis of a Mg^{2+}-block site of the NMDA receptor channel. Nature 1992; 358: 673-675.
42. Lerma J, Morales M, Ibarz JM, Somohano F. Rectification properties and Ca^{2+} permeability of glutamate receptor channels in hippocampal cells. Eur J Neurosci 1994. En prensa.
43. Gilberson TA, Scobey R, Wilson M. Permeation of calcium ions trough non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. Science 1991; 252: 1.613-1.615.
44. Brorson JR, Bleakman D, Chard PS, Miller RJ. Calcium directly permeates kainate/α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors in cultured cerebellar Purkinje neurons. Mol Pharmacol 1992; 41: 603-608.
45. Zeilhofer HU, Muller TH, Swandulla D. Inhibition of high voltage-activated calcium currents by L-glutamate receptor-mediated calcium influx. Neuron 1993; 10: 879-887.
46. McBain CJ, Dingledine R. Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurones of rat hippocampus. J Physiol (Lond.) 1993; 462: 373-392.
47. Mackler SA, Eberwine JH. Diversity of glutamate receptors subunit mRNA expression within live hippocampal CA1 neurons. Mol Pharmacol 1993; 44: 308-315.
48. Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J. AMPA receptors subtypes expressed by single Purkinje cells. Neuron 1992; 9: 247-258.
49. Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MVL, Zukin RS. Differential of three glutamate receptor genes in developing rat brain: An in situ hybridization study. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 4.157-4.161.
50. Sommer B, Seeburg PH. Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. Trends Pharmacol Sci 1992; 13: 291-296.

DISCUSIÓN

W. Buño: Usted ha realizado experimentos tomando tan sólo el calcio o el sodio como ion permeable. Quisiera preguntarle si existe alguna interacción cuando se colocan sodio y calcio juntos como iones permeables. Si existe interacción el modelo no va a funcionar, obviamente, ya que es un modelo lineal de suma de ajustes.

J. Lerma: Existe, efectivamente, interacción ya que se ha descrito que el calcio bloquea el receptor, o el canal de AMPA —y nosotros lo hemos comprobado también con el canal de kainato— lo que es extensible también al canal de NMDA. A la vez que permea, el calcio bloquea la corriente de sodio. En nuestro modelo no hemos utilizado 2 iones a la vez a la hora de determinar el grado de permeabilidad a calcio o la razón de permeabilidades calcio/cesio, porque es absolutamente necesario asumir condiciones biónicas para poder determinar el grado de permeabilidad del calcio con fiabilidad. La presencia de 2 iones permeantes crea confusión y complica tremendamente las estimaciones.

B. Soria: ¿Sabe si el magnesio citosólico desempeña algún papel en los procesos de rectificación que ha observado?

J. Lerma: Los registros se realizan en presencia de magnesio interno pero en su ausencia aparece también rectificación entrante. Aparentemente hay dos procesos de rectificación, uno de rectificación saliente y eso se debe a una voltajedependencia de la desensibilización exclusivamente. Si se suprime la desen-

sibilización con ciclotiacida no hay rectificación saliente. Pero la rectificación entrante sí que puede tener un origen iónico aun cuando no sea el magnesio. Este es un hecho que está siendo objeto de debate.

B. SORIA: En una de las diapositivas mostraba que el diazóxido afecta al sistema. Es una sustancia que abre canales de potasio. ¿El efecto que está mostrando es un efecto directo sobre el receptor o es un efecto a través de cambios del potencial de membrana?

J. LERMA: En nuestro grupo no hemos trabajado con diazóxido. Fue la segunda sustancia después del aniracetam que se probó y sirvió para demostrar que el receptor de AMPA tenía un lugar de modulación alostérica. Trabajamos con ciclotiacida, que tiene los mismos efectos ya que es un diurético y su estructura es muy parecida, son benzotiadiacinas. No sé a qué concentraciones actúa sobre los canales de potasio, sobre los canales de AMPA actúa a concentraciones muy bajas del orden micromolar.

J. LÓPEZ BARNEO: Querría volver a la interrelación sodio-calcio. En todas las curvas I/V que ha mostrado antes utilizaba soluciones con sodio (libres de calcio), o bien de calcio (libres de sodio). ¿Existen diferencias entre las curvas I/V de los receptores AMPA permeables y no permeables al calcio, si se utilizan concentraciones fisiológicas de estos iones? Por ejemplo, 140 mM de sodio y 2,5 mM de calcio.

J. LERMA: No, a nivel macroscópico de célula completa. Es posible que exista a nivel microscópico, me refiero en términos de curva I/V de canal único.

J. LÓPEZ BARNEO: Quisiera referirme a sus trabajos y a los de otros autores, que muestran que el receptor AMPA es permeable a calcio, ¿podría hacer un comentario sobre su posible localización dentro de una neurona?, ¿está distribuido uniformemente o cree que hay una distribución no uniforme en el soma, dendritas primarias y árbol dendrítico?

J. LERMA: Esta cuestión nos la planteamos al observar estos resultados, y realizamos registros en células de hipocampo disociadas agudamente de animales posnatales, es decir, que mantienen la polaridad en el sentido que el soma es soma y la dendrita apical es la dendrita apical. Mediante perfusión localizada de la membrana neuronal a nivel del soma o a nivel de la dendrita proximal, o de la dendrita apical pudimos comprobar que en el soma hay menos rectificación que en la dendrita proximal, y en la dendrita proximal más que en el soma y en la dendrita apical, por lo que a partir de la correlación, grado de permeabilidad-grado de rectificación, se puede inferir que en la dendrita proximal existen más receptores permeables a calcio que en el soma, o que en la dendrita apical. Por tanto, sí que hay una localización, una topología a lo largo del eje somatodendrítico.

J.E. ESQUERDA: En este contexto yo quisiera preguntar si alguien ha hecho la correlación entre la presencia de receptores AMPA permeables a calcio y la capacidad del AMPA para producir fenómenos de excitotoxicidad.

J. LERMA: Las células de Purkinje que no expresan NMDA muestran una gran sensibilidad excitotóxica a AMPA. En presencia de glutámico la célula de Purkinje muere y esa muerte es inducida a través de receptores de AMPA. Antes de conocer que el receptor de AMPA era permeable a calcio se creía que la toxicidad se debía a fenómenos osmóticos o a la activación de canales de calcio voltajedependientes, pero obviamente se trata de un efecto calciodependiente, y es antagonizado por antagonistas de los receptores de AMPA.

M. CRIADO: Usted ha presentado unas células que en un determinado porcentaje tienen unos receptores con unas características. ¿Es posible que durante el tiempo de cultivo de las células estos porcentajes se modifiquen?

J. LERMA: Es una buena pregunta. Al realizar cultivos se están seleccionando unas células que crecen bien y no se tiene en cuenta las células que crecen mal. Sin embargo, el porcentaje de células permeables a calcio o con rectificación de entrada en cultivos neuronales realizados a partir de embriones fue muy parecido al porcentaje de células con rectificación de entrada encontradas en células posnatales disociadas agudamente.

J. TAMARGO: Mi pregunta está relacionada con la que antes formuló el Dr. Soria; usted está observando el efecto de diazóxido que disminuye conductancia potasio y está observando el efecto de ciclotiacida, que al menos en las preparaciones que manejo también modifica en el mismo sentido la polaridad celular porque inhibe la conductancia calcio a través de canales L y T. Mi pregunta es: ¿tiene alguna forma de decirme qué conductancia modifican en esa preparación?

J. LERMA: No vemos el efecto de estos fármacos sobre otros canales que no sean los canales de AMPA ya que trabajamos en condiciones de fijación de voltaje. Por tanto, no hay acti-

vación de canales voltajedependientes, aparte de los que estén activos en el potencial de membrana en reposo; además, si hubiera canales de potasio activos al potencial de membranas en reposo, los tendríamos bloqueados mediante el cesio añadido dentro de la célula. Únicamente observamos corriente de AMPA al poner AMPA. Por todo ello, no hay ninguna contaminación en lo que se refiere a la acción de ciclotiacida por activación o desactivación de otros canales.

V. CEÑA: Cuando se cultivan neuronas u otro tipo de células se producen muchos fenómenos de desensibilización que pueden modificar la distribución de receptores. En el caso del hipocampo una posibilidad de prevenir este efecto es realizar experimentos en rodajas, la pregunta es: ¿han hecho experimentos en rodajas de hipocampo? y, si la respuesta es afirmativa, ¿obtienen los mismos resultados?

J. LERMA: Nosotros no, pero otros grupos han llevado a cabo experimentos tratando de correlacionar las curvas I/V con la permeabilidad calcio. El resultado que han obtenido ha sido absolutamente negativo, no han encontrado permeabilidad del calcio ni rectificación entrante en parches tomados del soma. Sin embargo, ya he señalado que en el soma hay menos receptores permeables al calcio que en la dendrita, lo que podría ser la causa.

B. SORIA: En relación con la pregunta anterior, si estas sustancias actúan directamente sobre el receptor, ¿ha revisado si hay trozos de secuencias homólogas entre este receptor y lo que se sabe de canales de potasio?

J. LERMA: No, es un aspecto muy reciente.

Canales de K^+ en la señal celular del calcio

F. Barros, D. del Camino, L.A. Pardo y P. de la Peña

Departamento de Biología Funcional. Área de Bioquímica. Universidad de Oviedo.

Introducción

Desde los trabajos pioneros de Hodkin y Huxley a principios de la década de los cincuenta[1,2], se ha hecho evidente que los canales de K^+ son responsables de la repolarización de los potenciales de acción mediados por Na^+, Ca^{2+}, Na^+ y Ca^{2+} o Cl^- en células eléctricamente excitables. Sin embargo, los canales de K^+ aparecen ampliamente distribuidos tanto en células eléctricamente excitables como en las no excitables, y en los últimos años está cada vez más claro que además de su ubicuidad, poseen un importante papel en la producción y/o el control de una gran variedad de respuestas en prácticamente todos los tipos celulares. Así, aparte de su capacidad para modular el patrón de disparo neuronal y de su papel en la codificación e integración de las señales neuronales, los canales de K^+ son componentes esenciales de los sistemas que controlan en todo tipo de células la homeostasis del Ca^{2+} celular, los procesos contráctiles y secretores o el volumen celular.

Desde hace más de 2 décadas se ha reconocido también un importante papel del Ca^{2+} intracelular como mediador en el denominado «proceso de acoplamiento estímulo-secreción»[3]. Tanto en tejidos eléctricamente excitables clásicos (nervio y músculo) como en células neuroendocrinas o exocrinas, el Ca^{2+} es ampliamente utilizado como mediador intracelular. Esto ha conllevado la aparición de una gran variedad de procesos celulares dedicados al control eficiente de la homeostasis del Ca^{2+}. Entre ellos se incluyen sistemas de entrada de Ca^{2+} extracelular (p. ej., canales de Ca^{2+} operados por receptor o por voltaje), sistemas de salida del Ca^{2+} citoplásmico al medio externo (p. ej., Ca^{2+}-ATPasas e intercambiadores Na^+-Ca^{2+}) y mecanismos de almacenamiento de Ca^{2+} (p. ej., orgánulos como el retículo sarcoplásmico, el retículo endoplásmico o las mitocondrias). Sin embargo, junto a estos sistemas de control directo de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico, existen otros, como los canales de K^+ que, aunque de modo indirecto, modulan de forma esencial la homeostasis del Ca^{2+} celular. Así, estos canales aportan una vía de repolarización para las células despolarizadas manteniendo, pues, el potencial de membrana basal. La hiperpolarización celular debida a la apertura de canales de K^+, tiende a eliminar el flujo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, y estimula la salida de Ca^{2+} a través de los intercambiadores Na^+-Ca^{2+} electrogénicos. Inversamente, el bloqueo de los canales de K^+ con la subsiguiente despolarización del potencial de membrana celular promueve la apertura de canales de Ca^{2+} y aumenta la excitabilidad celular. No obstante, es importante constatar que en células no excitables eléctricamente (p. ej., linfocitos, células endoteliales[4,5]) dicha despolarización puede causar una reducción del flujo de Ca^{2+} desde el medio externo a través de canales independientes de voltaje, debido a la disminución del gradiente electroquímico de Ca^{2+}. En células como las de los epitelios especializados en procesos de transporte de fluidos y electrólitos, las variaciones en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} son un parámetro importante de control del proceso secretor. En este caso, además de su posible papel en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+}, los canales de K^+ son esenciales para funciones como: *1)* el reciclado del K^+ cotransportado con los iones secretados a través del epitelio[6]; *2)* la repolarización de la membrana celular, necesaria para el mantenimiento de los gradientes electroquímicos requeridos para la energización de los flujos pasivos de iones[7] o del transporte acoplado de iones y solutos[8], y *3)* la prevención de los grandes cambios de volumen celular causados por las rápidas variaciones en las tasas de transporte transcelular[7,8].

La aparición de la técnica de *patch-clamp* en sus distintas configuraciones a comienzos de los años ochenta[9] hizo posible la caracterización de los canales iónicos presentes en una enorme variedad de células, así como el conocimien-

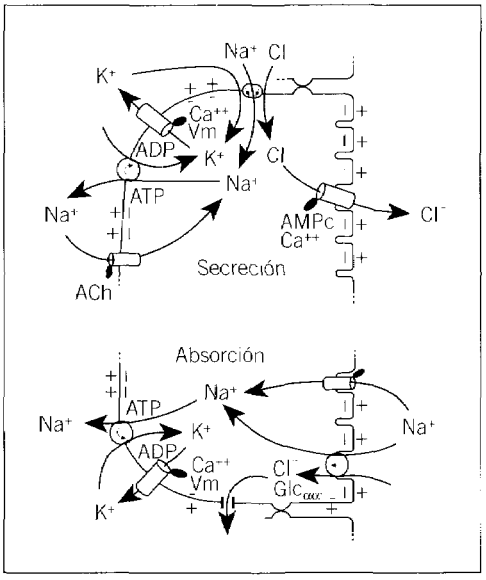

Fig. 1. Modelo esquemático de los componentes celulares clave en el control de movimientos iónicos durante los procesos absortivo-secretores en células epiteliales. Nótese la participación en el proceso secretor de canales de Cl^- regulados por segundos mensajeros (Ca^{2+}, AMPc) y situados en el polo luminal de la célula. Así mismo, se destaca la importancia de canales de K^+ en la membrana basolateral operados por Ca^{2+} y/o voltaje. Para más explicaciones, véase el texto; Glc: glucosa; αα': aminoácidos; ACh: acetilcolina; Vm: potencial de membrana.

to de la contribución de cada uno a las corrientes celulares totales. Estos conocimientos han sido complementados a partir de alrededor de 1985 mediante el uso de dicha técnica para obtener información acerca de los mecanismos de generación de señales por medio del Ca^{2+} citoplasmático. La comprobación de los efectos de la activación de distintos receptores, la introducción en el interior celular de distintos mensajeros o sus análogos, la combinación de los registros de *patch-clamp* con el uso de colorantes fluorescentes y, más recientemente quizá, la imbricación de la citada técnica con poderosas herramientas como la biología molecular, han permitido un acelerado avance en el campo de la transducción de señales incluidas, por supuesto, las mediadas por Ca^{2+}. A continuación se resumen algunos de los resultados y conclusiones obtenidos en nuestro laboratorio en los últimos años, centrados en las características y el posible papel de algunos canales de K^+ en las señales celulares mediadas fundamentalmente por Ca^{2+} en células adenohipofisarias, así como por Ca^{2+} y/o AMPc en epitelios secretores.

Canales de K^+ en epitelios secretores de fluidos y electrólitos

A pesar de la existencia de excepciones a esta regla, podría afirmarse que mientras la mayoría de las células endocrinas poseen la capacidad de generar potenciales de acción, las células epiteliales carecen de dicha capacidad[6]. Sin embargo, los epitelios absortivo-secretores de muchos tejidos (glándula salival, intestino, glándula sudorípara, páncreas exocrino, mucosa gástrica, córnea, glándula lacrimal y epitelio traqueal, entre otros), están sometidos a un estricto control nervioso y/o hormonal. En la mayor parte de estos tejidos, la activación hormonal o nerviosa de la secreción desencadena un incremento en la conductancia de la membrana luminal al Cl^-. El esquema simplificado de la figura 1 muestra, dejando aparte las evidentes variaciones particulares existentes entre distintos epitelios, un modelo general de los componentes claves en el control del transporte de electrólitos durante los procesos absortivo-secretores transepiteliales. Aunque incompleto, el modelo destaca la necesidad de un aporte de Cl^- a través de la membrana basolateral durante la secreción que compense el flujo del anión promovido por los mensajeros intracelulares (Ca^{2+}, AMPc) a través de la membrana luminal, y que asegure el mantenimiento de la tasa secretora durante un período de tiempo adecuado. Este aporte de Cl^- es realizado en muchos casos mediante la operación de un sistema de cotransporte Na^+-K^+-Cl^-, dependiente del gradiente de Na^+ y, por ello, de la operación de la Na^+-K^+-ATPasa selectivamente localizada en la membrana basolateral. El funcionamiento adecuado del sistema necesita, sin embargo, de un componente adicional, es decir, un canal de K^+ situado en la membrana basolateral que permita: *a)* el drenaje del posible exceso intracelular de K^+ aportado por el cotransportador Na^+-K^+-Cl^- y la Na^+-K^+-ATPasa; *b)* el aporte de K^+ al espacio extracelular que asegure la operación correcta del sistema de cotransporte Na^+-K^+-Cl^-, y *c)* el mantenimiento del potencial de membrana celular negativo en el interior, que compense el flujo de cargas negativas producido por la salida de los iones Cl^- y que mantenga así el gradiente electroquímico del anión asegurando el flujo continuado de este a través de la membrana luminal.

Dependiendo del tipo de epitelio considerado y del tipo de secretagogo implicado en la secreción, un control primario del proceso secretor es ejercido mediante la regulación de la apertura de los canales de Cl^- luminales por variaciones en las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} y/o AMPc. Sin embargo, la existencia en un gran número de epitelios de un canal basolateral de K^+ dependiente de Ca^{2+} y voltaje (frecuentemente del tipo maxi-K) asegura, así mismo, la coordinación del funcionamiento polarizado luminal-basolateral del epitelio. Bajo condiciones iónicas normales, pues el secretagogo tenderá a producir una corriente de Cl^- a través de la membrana luminal y una corriente de salida de K^+ a través de la basolateral, complementadas con un flujo paracelular de Na^+ hacia el lumen eléctricamente negativo y a través de las uniones intercelulares permeables, así como un flujo transepitelial de agua promovido por el gradiente osmótico generado.

La aplicación al epitelio ciliar ocular de un esquema como el descrito es complicada por la particular organización anatómica de aquél. Este epitelio, especializado en la producción del humor acuoso, está formado por 2 capas celulares, la pigmentada y la no pigmentada, enfrentadas por sus membranas apicales y conectadas por desmosomas y *uniones gap*. Esta complicada estructura ha dificultado enormemente la investigación de los mecanismos moleculares implicados en la formación del humor acuoso. También resulta evidente que la orientación de ambas capas supone el funcionamiento de la capa no pigmentada como un epitelio típicamente secretor, y el de la pigmentada como un epitelio absortivo.

Los estudios iniciales en preparaciones de iris-cuerpo ciliar revelaron la existencia de conductancias a K^+ dependientes de Ca^{2+} y bloqueables por Ba^{2+}, así como el importante papel secretor de la capa no pigmentada. La existencia de conductancias a K^+ bloqueables por Ba^{2+} fue posteriormente demostrada en células pigmentadas. Sin embargo, la realización de estudios similares en células no pigmentadas ha sido limitada por la escasa tasa de proliferación de dichas células en cultivo, especialmente de las células de origen humano. En nuestro laboratorio hemos utilizado una línea celular de epitelio ciliar humano que retiene la mayoría de las propiedades eléctricas del epitelio intacto y de las células no pigmentadas en cultivo primario, obtenida por transformación viral en el laboratorio del Dr. Coca-Prados[10]. Nuestros resultados[11] nos han permitido obtener una evidencia directa de la presencia de canales de K^+ de gran conductancia (203 ± 20 pS [n=6] con concentraciones simétricas de K^+ a ambos lados de la membrana) activados por Ca^{2+} y voltaje. Las características de dichos canales, los detectados más frecuentemente en parches de membrana de las células utilizadas, los colocan en la familia de los maxi-K. Del estudio de su operación in situ hemos podido deducir también que las células cultivadas mantienen un potencial de membrana basal de -36 ± 9 mV (n=10). Las propiedades de activación por Ca^{2+} y bloqueo por Ba^{2+} dependiente de voltaje son coherentes con la hipótesis de que estos canales tienen un importante papel en los procesos secretores que participan en la formación del humor acuoso. No obstante, puesto que no ha sido posible demostrar si las células cultivadas mantienen su polarización anatómica, la localización precisa de los canales estudiados no ha podido ser determinada. Así mismo, hemos podido detectar otros canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de menor conductancia y también bloqueables por Ba^{2+}[11]. Es, pues, evidente que tras la detección de estas entidades moleculares, el conocimiento de la importancia relativa de los distintos canales de K^+ en la secreción de fluidos y electrólitos por el epitelio ciliar requeriría una investigación mucho más detallada. Algo parecido podría decirse de los mecanismos por los que distintos efectores fisiológicos regulan el funcionamiento de los canales iónicos en las células del epitelio, controlando con ello la secreción del humor acuoso.

La actividad eléctrica en la señal del Ca^{2+} y en la función secretora de células endocrinas

Un gran número de células endocrinas almacenan sus productos de secreción principalmente en gránulos o vesículas secretoras. Existen actualmente amplias evidencias tanto bioquímicas como morfológicas de que, aunque estas células son estimuladas por distintos factores externos y secretan distintos productos, los secretan por la vía de un proceso común, la exocitosis. En la mayoría de las células endocrinas, la exocitosis requiere iones Ca^{2+} y la elevación de las concentraciones del catión en el citoplasma dispara o contribuye al proceso secretor. La alteración de la concentración de Ca^{2+} intracelular se produce esencialmente mediante tres mecanismos: *a)* incremento de la entrada de Ca^{2+} extracelular por aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática al Ca^{2+}; *b)* movili-

zación de Ca^{2+} contenido en depósitos intracelulares, y *c)* disminución de la salida del Ca^{2+} intracelular por el intercambio Na^+-Ca^{2+} o por la Ca^{2+}-ATPasa de la membrana plasmática. Los tres mecanismos han sido identificados en células endocrinas o neuroendocrinas. La contribución de cada uno al proceso secretor varía dependiendo del tipo de célula o de estímulo considerado. Sin embargo, en células productoras de potenciales de acción con un componente de Ca^{2+}, el control de la frecuencia y/o duración de dichos potenciales parece desempeñar un importante papel en el acoplamiento estímulo-secreción. Así, si bien la situación resulta más variada y compleja en las células endocrinas, la entrada de Ca^{2+} unida a los potenciales de acción puede resultar crucial para el control de la elevación de Ca^{2+} intracelular ligada a la exocitosis, de forma similar a la descrita para la liberación de neurotransmisores en las terminales nerviosas. Finalmente, junto a un papel directo en la secreción de la entrada de Ca^{2+} debida a un incremento en actividad eléctrica, dicha entrada puede resultar en un aporte de Ca^{2+} citoplasmático que *1)* amplifique la magnitud, la duración y la distribución espacial de las señales de Ca^{2+} originadas por la liberación del catión de depósitos intracelulares, y *2)* constituya en células excitables un mecanismo de recarga de los depósitos intracelulares, vaciados tras la interacción con la célula de determinados agonistas que generen mensajeros que movilicen Ca^{2+} de los citados depósitos.

Regulación hormonal de la respuesta secretora en células GH_3 de hipófisis anterior

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) tiene un importante papel neuroendocrino en la hipófisis anterior, estimulando la liberación de TSH en células tirotrofas de todas las especies de mamífero estudiadas, así como la síntesis y secreción de prolactina en células lactotrofas[12-14]. Debido a la complejidad del análisis de los datos derivados de hipófisis normales, una parte sustancial de lo que se conoce sobre los mecanismos de acción de factores hipotalámicos como la TRH se ha obtenido estudiando líneas celulares transformadas, de las cuales la línea lactotrofa/somatotrofa GH_3 está entre las más utilizadas. La unión de la TRH a su receptor específico desencadena en las células GH_3 una serie de acontecimientos que incluyen la interacción del complejo hormona-receptor con una proteína del tipo $G_{q/11}$[15,16], seguida de una activación de la fosfolipasa C. Esta activación da lugar a la producción de dos segundos mensajeros, inositol (1,4,5) trisfosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). Estos efectos se acompañan con una clara modificación bifásica de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+}, de la actividad eléctrica celular y de la secreción de prolactina y hormona del crecimiento[17-19]. Así, la adición de TRH produce inicialmente una rápida elevación de las concentraciones de Ca^{2+}, debida a la liberación del ion de depósitos intracelulares, que causa una rápida y transitoria estimulación de la secreción, así como una fase inicial de hiperpolarización transitoria debida a la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}. Esta primera fase es seguida de otra en la que la conductancia basal de la membrana se reduce por inhibición de canales de K^+ y en la que tanto la frecuencia de producción como la duración de los potenciales de acción es incrementada. Dado que los potenciales de acción de las células GH_3 son de Ca^{2+}, esta segunda fase de actividad eléctrica incrementada causa una elevación sostenida de las concentraciones intracelulares del catión divalente, fundamentalmente por entrada desde el medio extracelular, acompañada de una secreción hormonal mantenida.

La modulación por TRH de ciertos canales de Ca^{2+} o K^+ no es la causa primaria del incremento de la actividad eléctrica

Los mecanismos implicados en la producción incrementada de potenciales de acción por la TRH y las conductancias concretas causantes de este efecto no eran conocidos. El carácter dual de la cascada basada en la activación de la fosfolipasa C, junto con experimentos fundamentalmente bioquímicos, ha llevado a sugerir que la activación de la proteincinasa C (PKC) está implicada en los efectos mantenidos de la TRH, incluyendo la modulación de la actividad de los canales de K^+ que determinan la tasa de disparo. Sin embargo, aún no ha podido demostrarse ningún efecto de la PKC en una conductancia a K^+ concreta en células GH_3. Mediante experimentos de *clamp* de voltaje utilizando la configuración de «célula entera» de la técnica de *patch-clamp*, se ha descrito la atenuación de corrientes de K^+ dependientes de voltaje (del tipo denominado I_{Kv}) en células GH_3[20]. Así mismo, tanto en nuestro laboratorio como en otros, se ha comprobado mediante ex-

perimentos en condiciones de «parche perforado» la reducción por TRH de corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+} y voltaje[21,22], así como de la actividad de los canales de Ca^{2+} tipo L[22-24]. No obstante, es improbable que la reducción de cualquiera de estas corrientes sea la causa primaria de la segunda fase de hiperexcitabilidad porque:

1. El descenso de las corrientes activadas por despolarización y la dependencia de voltaje de las mismas difícilmente podrían explicar los rápidos cambios en el potencial y la resistencia basal que causan la leve despolarización que conlleva el incremento en la frecuencia de los potenciales de acción.

2. La disminución de la corriente I_{Kv} no ha sido detectada de forma consistente ni aun en condiciones de «*clamp* de célula entera», en las cuales, por otro lado, es difícilmente observable el incremento en la frecuencia de producción de potenciales de acción[21]. Además, dicha disminución no es detectable en condiciones de «parche perforado», en las que la respuesta hormonal es preservada en su totalidad[21,22].

3. La reducción de las corrientes de Ca^{2+}, que a su vez origina la disminución de las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+}, es aún difícil de reconciliar con la tasa incrementada de producción de potenciales de acción de Ca^{2+} y con los valores elevados del catión producidos durante la segunda fase de acción de la TRH.

Se ha sugerido que la inhibición de las corrientes de Ca^{2+} podría dar lugar indirectamente a una reducción en la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} y, con ello, el aumento en la excitabilidad celular[22,23]. Si bien es posible que la reducción de estas corrientes sea un importante determinante de la disminución de las tasas de despolarización y/o repolarización, y con ello en el aumento de la duración de las espigas, probablemente no constituya un factor crucial en la regulación de los intervalos entre espigas, es decir, de su frecuencia de producción. Así: *a)* los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de alta conductancia parecen desempeñar un papel fundamental en la repolarización de las espigas, pero no en la regulación de los intervalos entre espigas[25,26]; *b)* tras el tratamiento de las células GH_3 con ácido okadaico (OKA, un inhibidor de proteinfosfatasas de los tipos 1 y 2A), no ha podido detectarse incremento en la reducción por TRH de ningún componente de corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} ni de los canales de Ca^{2+} tipo L. Sin embargo, el efecto de la TRH sobre la actividad eléctrica sí es manifiestamente potenciado por el tratamiento con OKA[27,28], y *c)* la reducción de las corrientes de Ca^{2+} tipo L no es afectada por el tratamiento de las células GH_3 con toxina del cólera (CT). Sin embargo, de nuevo el efecto de la TRH sobre la actividad eléctrica se incrementa y su reversibilidad se antagoniza por dicho tratamiento[24].

Papel crucial de la corriente de K^+ rectificadora anómala en el control de la excitabilidad celular de las células GH_3 y mecanismos implicados en su modulación por TRH

Contrariamente a lo que ocurre con la reducción de las corrientes de Ca^{2+} tipo L (e indirectamente, pues, con la de las corrientes de K^+ dependientes de Ca^{2+}), existe una correlación directa entre los efectos de la hormona sobre la corriente de K^+ «rectificadora anómala» y la alteración de las tasas de disparo. Dicha corriente y su reducción por TRH fueron originalmente descritas por Bauer et al[29]. Sin embargo, la interpretación de sus resultados, obtenidos en condiciones de «*clamp* de célula entera» convencional es complicada por la rápida pérdida de los efectos de la TRH sobre la actividad eléctrica y sobre las corrientes iónicas bajo estas condiciones experimentales. De hecho, la reducción de esta corriente por TRH resulta irreversible en esta situación técnica, probablemente por la pérdida de factores citoplásmicos necesarios para restaurar el estado normal de los canales. Mediante el uso de la variante de «parche perforado», en nuestro laboratorio hemos obtenido resultados que indican que la reducción de la corriente rectificadora anómala constituye el punto más importante de control por TRH de la excitabilidad celular. Así mismo, la introducción de distintos compuestos y enzimas en el interior celular en condiciones de «*clamp* de célula entera» nos ha permitido concluir que la regulación de la corriente por la hormona es ejercida mediante un mecanismo de fosforilación/desfosforilación. Si bien la naturaleza de la proteincinasa implicada no es conocida aún, hemos podido demostrar que la proteinfosfatasa 2A es la enzima encargada de revertir los efectos de la hormona sobre la citada corriente. Estas conclusiones están basadas en los siguientes datos:

1. Las características cinéticas de la corriente de K^+ rectificadora anómala la convierten en

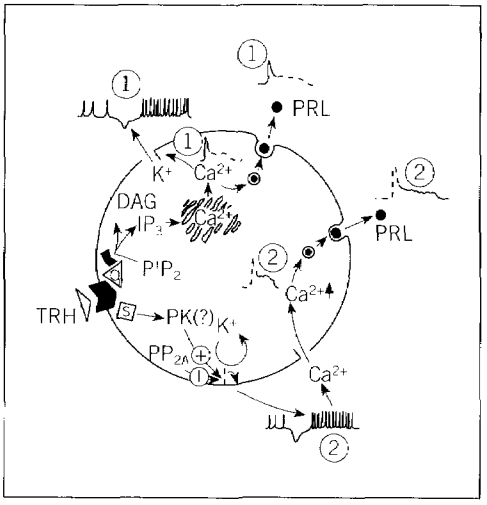

Fig. 2. Modelo esquemático de los componentes moleculares implicados en el acoplamiento estímulo-secreción a la TRH en células adenohipofisarias GH_3. La unión de la hormona a su receptor provoca: a) la activación de una fosfolipasa C por vía de una proteína G con la subsiguiente producción de inositol (1, 4, 5) trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir del fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PAP^2). La interacción del IP_3 con un receptor situado en la membrana de depósitos intracelulares de Ca^{2+} causa la liberación del catión al citoplasma, que a su vez origina una primera fase de secreción transitoria de prolactina (PRL) acompañada de una hiperpolarización de la membrana plasmática por apertura de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+}, y b) la activación de una proteincinasa (PK[?]) de identidad aún desconocida que, mediante la inhibición por fosforilación de canales de K^+ del tipo rectificador anómalo, origina la producción incrementada de potenciales de acción, con la subsiguiente entrada de Ca^{2+} extracelular al citoplasma y la generación de una segunda fase de secreción mantenida. Nótese la existencia de un mecanismo de recontrol de la operación de los canales de K^+ mediante la operación de la proteinfosfatasa 2A (PP_{2A}).

un candidato óptimo para actuar como un regulador de potencial a valores cercanos al potencial de membrana celular basal[27,29].

2. Las reducciones en la corriente se extienden durante períodos de tiempo coincidentes con aquellos en los que se produce el incremento en la actividad eléctrica[21,24,27,28].

3. El aumento del bloqueo de la corriente producido por la TRH tras la incubación con OKA se correlaciona con un incremento en el efecto de la hormona sobre la actividad eléctrica[27,28].

4. Un aumento similar al que se acaba de indicar tanto en la inhibición de la corriente como en los incrementos en actividad eléctrica se produce tras el tratamiento de las células con CT[24,30].

5. Únicamente la reducción de la corriente rectificadora anómala por TRH, pero no las reducciones de corrientes de Ca^{2+} o de K^+ dependientes de Ca^{2+} es potenciada por el tratamiento de las células con OKA o con CT[24,27].

6. La adición de TRH produce un desplazamiento del voltaje de inactivación de la corriente rectificadora anómala hacia potenciales menos negativos[27,29].

7. La incubación de las células GH_3 con CT produce una reducción de la tasa de oscilación de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular asociada con la actividad eléctrica. Bajo estas condiciones, la dependencia de voltaje de inactivación de la corriente rectificadora anómala es desplazada hacia potenciales más negativos[24].

8. La potenciación de la inhibición de la corriente rectificadora anómala por OKA indica que las reducciones en la misma causadas por la TRH son producidas mediante un mecanismo de fosforilación. La presencia de tal mecanismo es confirmada por la práctica anulación del efecto de la hormona al dializar el interior celular con un análogo de ATP incapaz de donar su fosfato gamma en reacciones de fosforilación[30].

9. La inhibición irreversible de la corriente observada en condiciones de «*clamp* de célula entera» convencional puede ser convertida en reversible de modo específico al dializar el interior celular con medios conteniendo la subunidad catalítica de la proteinfosfatasa 2A[30].

A partir del estudio de los efectos causados por el tratamiento con CT, y dado que los efectos de la toxina se producen por un mecanismo independiente de alteraciones en las concentraciones de AMP-cíclico celular hemos podido deducir así mismo, que junto a la activación de la fosfolipasa C por una proteína G insensible a modificación por CT y toxina pertúsica (es decir, del tipo $G_{c/11}$[16,17]), la TRH causa la inhibición de la corriente rectificadora anómala (y con ello el incremento de la actividad eléctrica) mediante el acoplamiento de su receptor a una proteína modificable por CT (probablemente del tipo G_S)[24,30].

Los conocimientos que hemos expuesto acerca de las células GH_3, se recogen de forma esquemática en el modelo mostrado en la figura 2. Es importante destacar que, si bien aplicable de forma estricta a la TRH y a estas células, es muy

probable que muchos de los aspectos considerados hasta aquí sean aplicables a otros tipos celulares. En cualquier caso, tras el estudio de los modelos celulares que hemos considerado, es evidente que la operación de los canales de K^+ y su modificación por distintos factores neurohormonales pueden resultar cruciales en la generación de señales de Ca^{2+} y en la regulación de la actividad secretora de muy diversos tipos celulares.

Agradecimiento

Los trabajos presentados han sido financiados con cargo a los Proyectos de Investigación PB87-1046 y PB90-0789 de la CICYT, así como por la concesión de una Beca de Investigación y un Contrato de Reincorporación de la FICYT y el MEC a D. del Camino y L.A. Pardo, respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hodkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J Physiol 1952; 116: 473-496.
2. Hodkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane currents and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol 1952; 117: 500-544.
3. Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. Br J Pharmacol 1968; 34: 451-474.
4. Mason MJ, Mahaut-Smith MP, Grinstein S. The role of intracellular Ca^{2+} in the regulation of the plasma membrane Ca^{2+} permeability of unstimulated rate lymphocytes. J Biol Chem 1991; 266: 10.872-10.879.
5. Laskey RE, Adams DJ, Cannell M, Van Breemen C. Calcium entry-dependent oscillations of cytoplasmic calcium concentration in cultured endothelial cell monolayers. Proc natl Acad Sci USA 1992; 89: 1.690-1.694.
6. Petersen OH, Maruyama Y. Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. Nature 1984; 307: 693-696.
7. Welsh MJ, McCann JD. Intracellular calcium regulates basolateral potassium channels in a chloride-secreting epithelium. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 8.823-8.826.
8. Schultz SG. Homocellular regulatory mechanism in sodium-transporting epithelia: avoidance of extinction by «flush-through». Am J Physiol 1981; 241: F579-F590.
9. Hamill OP, Marty E, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording form cells and cell-free membrane patches. Pflügers Arch 1981; 391: 85-100.
10. Martín-Vasallo P, Ghosh S, Coca-Prados M. Expression of Na, K-ATPase alpha subunit isoforms in the human ciliary body and cultured ciliary epithelial cells. J Cell Physiol 1989; 141: 243-252.
11. Barros F, López-Briones LG, Coca-Prados M, Belmonte C. Detection and characterization of CA^{2+}-activated K^+ channels in transformed cells of human non-pigmented ciliary epithelium. Curr Eye Res 1991; 10: 731-738.
12. Reichlin S. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. En: Wilson JD, Foster DW, editores. Williams textbook of endocrinology. Filadelfia: Saunders, 1985; 492-548.
13. Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF. Neuroendocrine regulation of prolactin release. Prog Neurobiol 1989; 33: 399-447.
14. Lamberts SWJ, McLeod RM. Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. Physiol Rev 1990; 70: 279-318.
15. Hsieh KP, Martin TFJ. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine trisphosphate-binding proteins G_q and G_{11}. Mol Pharmacol 1992; 6: 1.673-1.681.
16. Aragay AM, Katz A, Simon MI. The $G\alpha_{12}$ and $G\alpha_{11}$ proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in rat GH_3 rat pituitary cells. J Biol Chem 1992; 267: 24.983-24.988.
17. Ozawa S, Sand O. Electrophysiology of excitable endocrine cells. Physiol Rev 1986; 66: 887-952.
18. Drummond AH. The pituitary gland and its constituents cells. En: Michell RH, Drummond AH, Bushfield M, MacPhee CH, editores. Inositol lipids in cell signalling. Londres; Academic Press, 1989; 355-375.
19. Gershengorn MC. Role of inositol lipid second messengers in regulation of secretion: studies of thyrotropin-releasing action in pituitary cells. En: Oxford GS, Armstrong CM, editores. Secretion and its control. Nueva York: Rockefeller University Press, 1989; 1-15.
20. Dubinsky JM, Oxford GS. Dual modulation of K channels by thyrotropin-releasing hormone in clonal pituitary cells. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 4.282-4.286.
21. Barros F, Delgado L, Maciá C, De la Peña P. Effects of hypothalamic peptides on electrical activity and membrane currents of «patch perforated» clamped GH_3 anterior pituitary cells. FEBS Lett 1991; 279: 33-37.
22. Simasko SM. Reevaluation of the electrophysiological actions of thyrotropin-releasing hormone in a rat pituitary cell line (GH_3). Endocrinology 1991; 128: 2.015-2.026.
23. Kramer RH, Kaczmarek LK, Levitan ES. Neuropeptide inhibition of voltage-gated calcium channels mediated by mobilization of intracellular calcium. Neuron 1991; 6: 557-563.
24. Barros F, Villalobos C, García-Sancho J, Del Camino D, De la Peña P. The role of the inwardly rectifying K^+ current in resting potential and

thyrotropin-releasing-hormone-induced changes in cell excitability of GH_3 rat anterior pituitary cells. Pflügers Arch 1994. En prensa.
25. Lang DG, Ritchie AK. Tetraethylammonium blockade of apamim-sensitive and insensitive Ca^{2+}-activated K^+ channels in a pituitary cell line. J Physiol (Lond) 1990; 425: 117-132.
26. Lang DG, Ritchie AK. Tetraethylammonium ion sensitivity of a 35-pS Ca^{2+} activated K^+ channel in GH_3 cells that is activated by thyrotropin-releasing hormone. Pflügers Arch 1990; 416: 704-709.
27. Barros F, Delgado LM, Del Camino D, De la Peña P. Characteristics and modulation by thyrotropin-releasing normone of an inwardly rectifying K^+ current in patch-perforated GH_3 anterior pituitary cells. Pflügers Arch 1992; 422: 31-39.
28. Delgado LM, De la Peña P, Del Camino D, Barros F. Okadaic acid and calyculin A enhance the effect of thyrotropin-releasing hormone on GH_3 rat anterior pituitary cells excitability. FEBS Lett 1992; 311: 41-45.
29. Bauer CK, Meyerhof W, Schwarz JR. An inward-rectifying K^+ current in clonal rat pituitary cells and its modulation by thyrotropin-releasing hormone. J Physiol (Lond) 1990; 429: 169-189.
30. Barros F, Mieskes G, Del Camino D, De la Peña P. Protein phophatase 2A reverses inhibition of inward rectifying K^+ currents by thyrotropin-releasing hormone in GH_3 pituitary cells. FEBS Lett 1993; 336: 433-439.

DISCUSIÓN

A.G. García: Me pregunto si la movilización de calcio intracelular a priori por TRH no puede estar activando estos canales de potasio calcio-dependientes y ser motivo de esta hiperpolarización. Por otra parte, no acabo de entender todavía la vinculación con ese fenómeno de hiperexcitabilidad que da lugar después a la selección de canales de calcio y a la secreción. Algo parecido ocurre en la célula cromafín de gato donde los agonistas muscarínicos producen una respuesta secretora y no se conoce bien cómo se produce eléctricamente, lo que sí sabemos es que los agonistas muscarínicos generan una señal de calcio intracelular por movilización de calcio intracelular y que activan una corriente de potasio de pequeña conductancia calcio-dependiente. Lo que por el momento se desconoce es si existe un canal de cloro involucrado que pueda producir una despolarización subsiguiente por salida de cloro y eso generar potenciales de acción y reclutamiento de canales de calcio. Quisiera preguntarle: ¿existe alguna analogía entre este sistema que describo en la célula cromafín con el receptor muscarínico y la TRH en la hipófisis anterior?

F. Barros: No existe una correlación entre la denominada fase 1 producida por la liberación de calcio en depósitos y la fase 2, y parece que los dos mecanismos son independientes. Respecto a si puede haber en otros tipos de células mecanismos parecidos, creo que en cada tipo de célula la hiperexcitabilidad se podrá dar de forma distinta.

W. Buño: En el experimento que mostró de *current clamp* se observan potenciales de acción e inmediatamente después de la hiperpolarización las espigas son más pequeñas, lo que apoya un aumento de conductancia durante este tiempo. Sin embargo, propone que se están cerrando canales de potasio, y que la despolarización que ve y el aumento de la actividad es por un cierre de los canales de potasio. Creo que debe intervenir algún otro factor, por ejemplo, activación de canales de calcio ya que de otro modo no se explica que las espigas sean más pequeñas de tamaño. Por otra parte, me gustaría que aclarara algunas cuestiones relativas al rectificador anómalo. La primera es cómo un bloqueo de un rectificador anómalo logra aumentar la actividad y, la segunda, ¿cómo es que después de que termine el curso hiperpolarizante con el que activa, el rectificador anómalo tiene una tremenda cola de entrada?, y ¿qué es esa cola de entrada?

F. Barros: Para la obtención de estos registros se aplicó una considerable cantidad de filtrado, a efectos de observar frecuencias de espigueo en períodos largos de tiempo porque, de lo contrario, sería absolutamente imposible obtener 30 min de registro, debido a limitaciones en la capacidad del ordenador. Por otra parte, los potenciales de acción durante la fase 2 no son cinéticamente iguales a los que la célula tiene antes de añadir TRH, sino que son bastante más anchos, tienen una despolarización y una repolarización bastante más

lenta, de tal forma que aparte de que haya más potenciales de acción se debe considerar también la posibilidad de que los propios canales de calcio que en parte se encuentran bloqueados estén abiertos durante mucho más tiempo, y que la señal del calcio verdaderamente pueda ser bastante mayor.

En cuanto a la cola de entrada, la explicación es muy sencilla; estas células tienen una corriente de potasio voltajedependiente, que cuando se mantiene un potencial de membrana fijo de entre –20 y 0 mV está totalmente inactivada, pero durante 500, 600 ms o 1 s de hiperpolarización que se utiliza para ver el rectificador anómalo esta corriente se reactiva, y al volver a –10, o 0 o –20 mV, se ve la cola que se debe a la operación de los canales de potasio voltajedependientes que, por cierto, no se modifica con TRH ni con otra serie de fármacos. Es un control interno que nos puede servir, y por eso hacemos el experimento y mantenemos esa cola ahí para saber si el efecto es realmente específico sobre el rectificador o existen problemas de resistencia en serie u otro tipo de problemas que modifiquen otras conductancias, y específicamente este canal dependiente de voltaje.

J. García-Sancho: Quisiera insistir en un punto que usted ha mencionado al principio. En células no excitables la apertura de canales de potasio o de cloruro es importante para mantener el gradiente electroquímico para que el calcio pueda entrar, es decir, si el calcio entra y esa entrada es electrogénica y se colapsa el gradiente, eso mismo detiene la entrada.

Canales de potasio sensibles a ATP. Sulfonilureas y activadores de canales de potasio

B. Soria

Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Alicante.

Introducción

Tipos de canales de K^+. Clasificación electrofisiológica y funcional

Los canales de K^+ son proteínas integrales de membrana que permiten el paso selectivo a través del ion K^+. Son ubicuos, diversos y existen más de 20 tipos distintos. Su potencial farmacológico y terapéutico está determinado por sus especiales características biofísicas, fisiológicas y distribución celular. Los canales de K^+ pueden clasificarse a partir de su cinética de apertura-cierre, propiedades de activación e inactivación, modulación por ligandos o por voltaje y por su sensibilidad característica a una gama amplia de agentes farmacológicos[1]. La tabla I expone una clasificación no exhaustiva de los canales de K^- (p. ej., no incluye canales regulados por volumen o activados por Na^+).

El canal de K^+ regulado por ATP (K_{ATP})

El adenosintrifosfato (ATP) se encuentra en las células a concentraciones superiores a las requeridas para mantener la actividad de las bombas iónicas y procesos contráctiles, función garantizada además por la existencia de otros depósitos intracelulares de fosfocreatina y compuestos con enlaces de alto valor energético. Por lo tanto, no parece que haya base para considerar al cociente ATP/ADP como una señal reguladora de las funciones celulares en condiciones normales. En 1983, Noma describió un nuevo tipo de canal en membranas celulares cardíacas[2]. Se trataba de un canal que se bloqueaba cuando el ATP aumentaba en la cara citosólica del mismo. En la actualidad existen suficientes evidencias de que el ATP intracelular regula un tipo de canales de K^+ presentes en la célula beta pancreática, músculo cardíaco, músculo liso y ciertas neuronas[3]. Aparte de funcionar como un sensor de glucosa (véase posteriormente) un canal con estas características puede ser de utilidad como mecanismo de protección frente a la isquemia celular en células nerviosas o en el miocardio. La isquemia induce una disminución en la concentración intracelular de ATP, como consecuencia de ello el canal estará activado y la célula se hiperpo-

TABLA I
CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE K^-

	Agente farmacológico		
	Toxinas	*Sintéticos*	*Iones*
Regulados por voltaje			
Rectificador retrasado	Dendrotoxina, Noxiustoxina	TEA, 4-AP (débil)	Ba^{2+}, Cs^+
Transitorio (IA)	Dendrotoxina MCDP	9-AA, quinina	
Rectificador de entrada		TEA	Cs^+
Regulados por ligandos			
K_{Ca} MK	Caribdotoxina	TEA, quinina	Ba^{2+}
K_{Ca} LK	Apamina, Lq VIII	Quinina, 9AA	
K_{ATP}		Sulfonilureas	
Acoplados a proteínas G			
K_{ACh}		AP	Ba^{2+}, Cs^+

larizará, lo que impide la apertura de canales de Ca^{2+} y, por lo tanto, el aumento del $(Ca^{2+})_i$, lo que en condiciones de bajo ATP es extremadamente tóxico.

Caracterización bioquímica

En la actualidad se desconoce la estructura molecular del canal K_{ATP}. La metodología que se está utilizando es la purificación y determinación de las características bioquímicas del receptor de sulfonilureas sin que se conozca a ciencia cierta si el receptor de sulfonilurea y el canal K_{ATP} son una misma entidad molecular o se trata de proteínas asociadas. Mediante técnicas no desnaturalizantes y el análisis de inactivación por radiación se ha estimado un peso molecular aproximado de 134-182 kD para el receptor de sulfonilurea. La secuenciación de esta proteína permitirá conocer si hay secuencias homólogas con otros canales de K^+, en último caso si se trata del canal o de una proteína asociada.

Propiedades biofísicas y fisiológicas del K_{ATP}

Permeabilidad iónica y conductancia

El canal K_{ATP} es muy selectivo para potasio y la permeabilidad al Na^+ es prácticamente despreciable. El Rb^+ puede sustituir al K^+ con idéntica permeabilidad y ha sido utilizado como trazador del flujo a través del canal. Se trata de un canal independiente de tiempo y voltaje ya que las distribuciones de canal abierto y cerrado no cambian sustancialmente con el potencial de membrana. En presencia de 5 mM de K^+ el canal K_{ATP} de la célula beta pancreática posee una conductancia para las corrientes de salida de aproximadamente 12 pS, mientras que para las corrientes de entrada (140 mM de K^+ en la pipeta) es de unos 50 pS. La relación corriente-voltaje para el canal único muestra que el canal rectifica (en un medio simétrico las corrientes de salida son menores que las de entrada). Parece claro que la principal causa de la rectificación es el bloqueo dependiente de voltaje de las corrientes de salida por cationes intracelulares, principalmente Na^+ y Mg^{2+}. En parches escindidos se ha podido observar un segundo canal sensible a ATP. Es de menor conductancia (5 pS para corrientes de salida en 140 mM de K^+ y aproximadamente de 4 pS en condiciones fisiológicas) y del que se desconoce todavía su papel fisiológico. Por otra parte, el canal K_{ATP} descrito en la fibra muscular lisa posee una conductancia mucho mayor (130 pS para 120 mM de K^+ intracelular y 60 mM de K^+ externo) que el K_{ATP} del músculo cardíaco y de la célula beta. Es decir, se trata de una familia heterogénea de canales de K^+[3,4].

Modulación por nucleótidos

La principal propiedad de este canal es su modulación por ATP intracelular. La modulación se realiza de dos formas: bloqueo al aumentar la concentración de ATP[5-7] y mantenimiento de la actividad del canal para concentraciones más bajas[8,9].

Bloqueo. Este es un efecto directo de la molécula y no parece mediado por la fosforilación del canal, ya que los análogos no hidrolizables de ATP son capaces de producir un bloqueo similar en parches encindidos. La secuencia de efectividad de los derivados de adenina es: ATP>ADP>AMP>adenosina. Más recientemente, la utilización de un protocolo que impide el «lavado» de los canales dependientes de ATP ha permitido precisar el valor de la constante aparente de disociación en 18 μM. Parece difícil reconciliar la extraordinaria sensibilidad para el ATP del canal K_{ATP} con las concentraciones intracelulares de dicho nucleótido (normalmente en el intervalo nM). Existen varias líneas argumentales para tratar de explicar este hecho: *1)* el canal está regulado por el cociente ATP/ADP. Se ha podido comprobar que ADP compite con el ATP e inhibe la inhibición; *2)* este canal está también regulado por pH y por Mg^{2+}, y *3)* es muy probable que la membrana plasmática esté siendo regulada por una reserva distinta que el resto de actividades citoplásmicas y que cerca de la membrana el ATP varíe de forma mucho más rápida que el ATP global. En el músculo cardíaco se demostró que los sustratos glicolíticos eran más eficaces abasteciendo el ATP necesario para bloquear el canal que los sustratos mitocondriales.

Modulación. La acción de los nucleótidos sobre este canal es compleja. Así, el ATP, que se pensó inicialmente que sólo bloqueaba el canal K_{ATP}, también reactiva los canales tras el «lavado»[8,9]. Este efecto, al contrario de lo que ocurre con el bloqueo, parece depender del Mg^{2+}. Es decir, el ATP, que se comporta como un bloqueador a concentraciones más altas, es al mismo tiempo necesario para que el canal mantenga una probabilidad alta de apertura.

Para poderlo registrar en el modo de célula entera el interior de la pipeta debe contener 0,3 mM de ATP, lo que permite estudiar durante un largo período la conductancia del canal de potasio dependiente de ATP. Todo parece indicar que se trata de un canal con una modulación en la que participan segundos mensajeros, el potencial *redox* intracelular (NADPH/NADP), proteínas G, etc. En estudios realizados en la configuración de «célula abierta» en los que se mantiene la integridad del citosqueleto y de ciertas estructuras se ha comprobado que el proceso de lavado es mucho más lento y que el ATP, incluso a concentraciones de 5 mM, no llega a bloquear completamente el canal.

Papel del canal K_{ATP} en la actividad eléctrica del músculo cardíaco y en músculo liso vascular

En 1978, Carmeliet ya indicó que el efecto más notable de la hipoxia cardíaca es el acortamiento del potencial de acción. Dicho efecto había sido descrito 20 años antes por Trautwein, Corabeouf y otros autores. En 1983, Noma describió la presencia de canales selectivos a potasio que eran inhibidos por ATP intracelular (K_{ATP}), postulando que dichos canales serían los responsables del acortamiento del potencial de acción[2]. La activación del K_{ATP} produce un acortamiento del potencial de acción y la hiperpolarización del músculo liso vascular.

Papel del canal K_{ATP} en la actividad eléctrica de la célula beta pancreática

En la célula beta en reposo la permeabilidad dominante es la debida al canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP})[9]. Se trata de un canal que se inhibe por ATP aplicado por la cara interna de la membrana. Ashcroft et al[3,5] lo llamaron canal G porque su actividad disminuye cuando se aplica glucosa a células intactas. Este canal disminuye también su probabilidad de apertura en presencia de otros nutrientes como manosa, leucina, gliceraldehído y alfacetoisocaproato. Este grupo de sustancias poseen la característica común de metabolizarse y producir un aumento del ATP intracelular y todos ellos pertenecen a la categoría de iniciadores de la secreción de insulina. Lactato y arginina, que actúan como potenciadores de la secreción inducida por un iniciador, no afectan a este canal (aunque sí disminuyen la apertura del canal K_{Ca}). Se trata de un canal regulado metabólicamente cuyas propiedades lo convierten en firme candidato al «sensor de glucosa» en las células beta pancreáticas y posiblemente en otras células como las hipotalámicas responsables de la sensación de hambre y de saciedad. Utilizando la configuración de *cell-attached* se ha podido comprobar que este canal se bloquea para concentraciones bastante bajas de glucosa (5 mM), por lo que se puede pensar que este canal contribuye sólo a una despolarización inicial de aproximadamente 5-10 mV y que no participaría en la respuesta oscilatoria. Para la génesis de ondas lentas se necesitaría de la participación de otro canal, posiblemente el canal por Ca^{+2} y voltaje (K_{Ca}) que funciona en el intervalo de concentraciones citosólicas de Ca^{+2} [10,11] y de potenciales de membrana que se darían en la respuesta oscilatoria, aunque la conducta oscilatoria puede también explicarse por la inactivación de un canal de K^+.

Farmacología del canal K_{ATP}

Los canales iónicos como receptores farmacológicos

Los canales iónicos pueden considerarse como un tipo especial de efectores celulares. Están acoplados a una gran variedad de inputs informacionales y sirven para permear de forma eficiente y selectiva determinados iones (Na^+, K^+, Ca^{2+} y Cl^-). El criterio de selectividad farmacológica es la base de sus aplicaciones terapéuticas y hace posible hablar de los canales iónicos como receptores farmacológicos. El canal K_{ATP} es bloqueado con baja especificidad por gran parte de los bloqueadores de canales de K^+, como tetraetilamonio, quinina y quinidina pero, sin embargo, posee la capacidad mucho más específica de ser bloqueado por sulfonilureas.

Bloqueo por sulfonilureas

Se sabe desde los trabajos de Loubatieres que las sulfonilureas (tolbutamida, glibenclamida) son eficaces en el tratamiento de la diabetes mellitus no insulinodependiente (tipo II). Más recientemente, se pudo comprobar que las sulfonilureas bloqueaban el K_{ATP}[12]. El bloqueo de dicho canal induce de forma simultánea el aumento de $[Ca^{2+}]_i$[13,14]. El canal de potasio dependiente de ATP, o un péptido asociado al mismo, se considera el sitio diana para el efecto de las sulfonilureas hipoglucemiantes. Tolbutamida y glibenclamida se unen a un receptor y «con-

gelan» el canal en su configuración cerrada. Esta propiedad permite utilizar dichos fármacos como marcadores del canal K_{ATP} (o de una proteína asociada al mismo) y representar un papel similar al de la TTX para el canal de Na^+, la w-conotoxina y las dihidropirinas para determinadas subunidades de los canales de calcio y la apamina y la caribdotoxina para ciertos canales de potasio. En ausencia de glucosa las sulfonilureas son capaces de despolarizar la célula beta e iniciar la descarga continua de espigas y, por lo tanto, el aumento del $[Ca^{2+}]_i$. Es importante señalar que este canal posee una respuesta alterada a sulfonilureas (glibenclamida, tolbutamida) y quinina en ratones obesos e hiperglucémicos. Estos ratones, por otra parte, son sensibles a la apamina (un bloqueador del canal de K^+ activado por Ca^{2+} de baja conductancia que no afecta a los ratones normales). Esta puede ser una indicación de «dónde» buscar alteraciones en los trastornos en la secreción de insulina en algunas formas de diabetes[15]. En humanos el canal K_{ATP} posee idénticas propiedades en cuanto a conductancia, cinética, sensibilidad al ATP e inhibición por sulfonilureas.

Efecto de los activadores de canales de K^+

Este grupo de sustancias incluye el nicorandilo, minoxidilo, pinacidilo, cromakalino (BRL 34915) y RP 49356. La química y selectividad tisular ha sido revisada recientemente por Roberston y Steinberg[16]. La identificación del canal K_{ATP} en el músculo liso vascular ha abierto la posibilidad de explorar dichos compuestos en el control de la presión arterial. El pinacidilo fue desarrollado a mediados de los setenta por Leo Pahrmaceuticals a partir de una serie de tioalkilureas apreciándose su papel de vasodilatador potente, aunque no fue hasta 1987 cuando se le reconoció como un activador de canales de K^+. Cromakalina y RP 49356 son muy distintos desde el punto de vista químico, sin embargo, su efecto farmacológico es indistinguible en músculo cardíaco y músculo liso vascular.

Los activadores del canal de K^+ son compuestos de baja especificidad. La cromakalina puede bloquear una corriente de K^+ basal en el músculo cardíaco. Más importante, cromakalina puede actuar sobre un canal de potasio activado por calcio en músculo liso vascular incorporado en bicapas lipídicas, pero cambiando la dependencia de voltaje del canal. Se desconoce el verdadero papel que in vivo desempeña esta inhibición.

TABLA II
APLICACIONES TERAPÉUTICAS
DE LOS MODULADORES DEL CANAL K_{ATP}

Sulfonilureas
Isquemia cardíaca y cerebral
Secreción de insulina (diabetes tipo II)
Arritmias de origen isquémico
Activadores
Angina
Antiarrítmicos
Asma
SNC
Antiepilépticos
Antineurotoxinas
Crecimiento capilar
Hipertensión
Síndrome de la vejiga irritable
Síndrome del colon irritable
Isquemia
Fatiga muscular
Antiarrítmicos
Arritmia cardíaca

El mecanismo ha sido explorado en el músculo cardíaco. Existen suficientes evidencias experimentales que sugieren que esos agentes disminuyen la sensibilidad del canal por el ATP. Actúan desplazando la curva dosis-respuesta para la inhibición hacia la derecha, sin ninguna modificación en el coeficiente *n* de Hill de dicha curva. Esta demostración podría sugerir que los 2 agentes actúan sobre un sitio común. La evolución temporal de los procesos de apertura y cierre del K_{ATP} están alterados en presencia de activadores del canal de K^+.

Aplicaciones terapéuticas de los moduladores del canal K_{ATP}

Existen pocas dudas acerca de la potencialidad terapéutica de la intervención farmacológica de los canales de K_{ATP}. La tabla II recoge un resumen de las aplicaciones terapéuticas de los agentes farmacológicos que modulan el canal K_{ATP}. Como puede comprobarse, abarcan desde la diabetes tipo II a la isquemia cerebral y la cardíaca, la hipertensión y la arritmia cardíaca. Existen otros campos en los que puede interesar su potencial terapéutico: la reacción entre el crecimiento capilar y los activadores del canal aún no se ha definido con exactitud. Las áreas adicionales de investigación que pueden resultar de importancia considerable incluyen al sistema inmune ya que la activación del canal

de K^+ es un componente integral de la activación de los linfocitos B y T.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Inc., Sunderland: Sinauer Assoc. 1992.
2. Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. nature 1983; 305: 147-148.
3. Ashcroft FM. Adenosine 5'-triphosphate sensitive potassium channels. Ann Rev Neurosc 1988; 11: 97-118.
4. Atwater I, Rojas E, Soria B. Biophysics of the Pancreatic B-cell, Nueva York: Plenum Press, 1986.
5. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic cells. Nature 1984; 312: 446-448.
6. Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. Nature 1984; 311: 271-273.
7. Ashcroft FM, Harrison DE, Ashcroft SJH. Properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic β-cells. J Physiol 1988; 400: 501-527.
8. Ohno-Shosaku T, Zunkler BJ, Trube G. Dual effect of ATP on K^+ currents of mouse pancreatic B-cells. Pflügers Arch 1987; 408: 133-138.
9. Soria B, Chanson M, Giordano E, Bosco D, Meda P. Ionic channels in glucose responsive and unresponsive B-cells. Diabetes 1991; 40: 1.069-1.078.
10. Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, Rosario LM. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^+ concentration ressembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. FEBS Lett 1989; 259: 19-23.
11. Santos RM, Rosario LM, Nadal A, García-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations fue to bursting electrical activity in single pancreatic islets. Pflügers Arch 1991; 418: 417-422.
12. Ashford MLJ, Sturgess NC, Cook DL, Hales CN. K-channels in an insulin secreting cell line: effects of ATP and sulphonylureas. En: Atwater I, Rojas E, Soria B, editores. Biophysics of the Pancreatic B-cell. Nueva York: Plenum Press, 1986; 69-76.
13. Valdeolmillos M, Nadal A, Contreras D, Soria B. The relationship between glucose-induced K(ATP) channel closure and the rise in $[Ca^{2+}]_i$ in single mouse pancreatic islet cells. J Physiol 1992; 455: 173-186.
14. Valdeolmillos M, Nadal A, Soria B, García-Sancho J. Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{+2}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islet of Langerhans. Diabetes 1993; 42: 1.210-1.214.
15. Soria B. Physiology and Pathophysiology of the Islets of Langerhans. Nueva York; Plenum Press, 1994. En prensa.
16. Robertson DW, Steinberg MI. K^+-channel openers: scientific applications and therapeutic promise. J Med Chem 1990; 33: 1.529-1.541.

DISCUSIÓN

J. López Barneo: En relación con este canal regulado por ATP que, como usted ha comentado, es bastante ubicuo ¿hay alguna característica del que se expresa en célula beta que le haga distinto de otros canales regulados por ATP, como el del corazón o del músculo liso?

B. Soria: En principio, las propiedades de conductancia y de rectificación del canal en célula beta y en músculo cardíaco son bastante parecidas. Recientemente se ha descrito uno en músculo liso que tiene una conductancia mucho mayor, es decir, la conductancia para estos canales en músculo liso y en célula beta pancreática está entre 50 y 60 pS para 140 mmol potasio en la pipeta, si vamos a concentraciones fisiológicas posiblemente esté alrededor de 25 pS, pero en el músculo liso se han descrito canales de hasta 130 pS. Por otra parte, la rectificación o el bloqueo del canal por ATP en el caso de la célula beta es Mg^2-ATP, y no ATP libre, mientras que en músculo cardíaco parece que tanto el Mg^2-ATP como el ATP libre son capaces de bloquearlo.

A.G. García: Clínicamente, la limitación que poseen muchos de estos fármacos es su escasa selectividad. De hecho, lo primero que se exploró de los activadores de canales de potasio es su efecto antiarrítmico, aunque su uso en esta indicación se ha desechado debido a la toxicidad y a su efecto arritmógeno. Sin embargo, al igual que ocurre con los canales de calcio, los canales de potasio muestran diferencias en los distintos tejidos.

C. González: ¿Podría haber alguna relación entre la regulación del flujo coronario y los canales de potasio sensibles a ATP?

B. Soria: Sí, esa es una de las opciones que se han postulado. Hay quien opina que podría ser precisamente la caída de ATP y el aumento del ADP, AMP o adenosina, lo que podría regular este canal desde la cara intracelular. La regulación de este canal es bastante compleja y,

por otra parte, presenta paradojas en el sentido de que la concentración de ATP dentro de las células es de 5 o 6 mmol mientras que la K_i del canal es 20, 50, 70 mmol, con lo cual lo primero que hay que explicar es a qué se debe esta diferencia tan notable. Existen varias líneas de explicación y una de ellas es el cociente ATP/ADP; el ADP se comporta más como activador del canal, y posiblemente las variaciones del cociente ATP/ADP tienen gradientes. El ATP se consume sobre todo en la zona de la membrana porque las bombas necesitan ATP, y allí donde se consume el ATP se está generando ADP. En la vecindad de la cara interna del canal, que es de lo que estamos hablando se produce una disminución de ATP y un aumento de ADP, lo que contribuye a la regulación.

C. GONZÁLEZ: Pero eso sería a la inversa en la célula beta en la que necesitamos que se genere el ATP.

B. SORIA: El mecanismo es básicamente el mismo. Lo que ocurre en la célula beta es que está en condiciones de ATP más basales, y el ATP sí que aumenta cuando se aportan nutrientes. Posiblemente la explicación del gradiente o del cociente ATP-ADP no sea suficiente; se ha hablado de un activador interno que nunca se ha caracterizado bien, de una sensibilidad distinta cuando uno separa el parche escindido de cuando está unido a todo el citosqueleto o que puede haber regulación por cofactores reducidos. En realidad, la pregunta de cómo se regula el canal continúa abierta.

M. HURLÉ: Querría saber si estos canales pueden ser modulados directamente a través de proteínas G y qué sistemas de neurotransmisión podrían estar implicados.

B. SORIA: Hay al menos 4 o 5 sustancias, no me atrevo a decir neurotransmisores, somatostatina, galanina o posiblemente el CGRP, que parece ser que abren el canal a través de un mecanismo de proteína G, es decir que, aparte de la acción directa del ATP a nivel interno al menos para galanina y somatostatina existen bastantes evidencias que el mecanismo de acoplamiento es una proteína G.

M. HURLÉ: ¿Por qué muchas veces nos encontramos con discrepancias entre los estudios electrofisiológicos, donde quizá no se pueden manipular con sulfonilureas las acciones de un determinado fármaco o neurotransmisor cuando, por el contrario, algunos estudios funcionales ponen de manifiesto con facilidad este tipo de interacciones? ¿Hasta qué punto cuando en un estudio funcional observamos una interacción de este tipo podemos deducir que un determinado canal está modulado por un fármaco o sistema de neurotransmisión concretos?

B. SORIA: En el preparado in vitro, y cuando sólo se estudia el canal, de alguna forma es fácil interpretar los resultados. En el animal entero esto no es así ya que cuando un canal está en múltiples localizaciones el problema es precisar en qué condiciones se encuentra cada territorio diana para ese fármaco.

C. MONTIEL: ¿Las células beta disparan ante el estímulo de glucosa de forma sincrónica, o hay células que son refractarias a la glucosa en un momento dado?

B. SORIA: En realidad algunas de las imágenes que he mostrado son del islote entero, no son de célula única, y hay por lo menos un par de trabajos que exploran específicamente la sincronía. Hasta donde sabemos es un fenómeno bastante sincrónico en todo el islote y esta sincronía de alguna forma está reflejando que todas las células están contestando y pensamos que el hecho de que las células beta estén organizadas en islote y no dispersas aisladamente tiene que ver precisamente con esta selección por parte de las células más activas para secretar de las que están menos activas para secretar. Entonces, el islote se convierte en un mecanismo de alta eficacia para la secreción de insulina.

J. TAMARGO: Quisiera referirme a los activadores del canal de potasio. Estoy absolutamente de acuerdo con lo que ha dicho el Dr. Soria con respecto a miocardio y con respecto a célula beta; sin embargo, esto es un ejemplo de cómo algo que tiene un gran interés académico carece de aplicación desde el punto de vista clínico. Nadie ha comercializado ninguno de estos productos, ni creo que los comercialice en los próximos años, por dos motivos; primero, porque un aumento marcado de la conductancia del potasio acorta mucho la duración del potencial de acción y produce arritmias; y segundo, porque la reducción de la presión arterial se obtiene a costa de un efecto muy rápido y muy brusco que activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el tono simpático, lo cual obliga a añadir un bloqueador beta, además de que producen retención hidrosalina.

Canales de potasio regulados por oxígeno

J. López Barneo

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica. Universidad de Sevilla.

Introducción

El oxígeno, uno de los elementos más abundantes de la biosfera, es de importancia crucial para el mantenimiento de la mayoría de las formas de vida sobre la Tierra. Este elemento es el aceptor final de los electrones en la cadena respiratoria y, por lo tanto, permite la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa. A pesar de su importancia fundamental, se dispone de un conocimiento muy limitado sobre la forma en que los organismos son capaces de detectar la disponibilidad de O_2 y de adaptar la captación del gas a las diversas situaciones fisiológicas y condiciones ambientales. En animales muy evolucionados como los mamíferos, con un metabolismo energético alto, el suministro de O_2 a las células se asegura mediante los sistemas respiratorio y circulatorio. El O_2 se difunde en la sangre en los pulmones, se concentra por la unión a la hemoglobina y, junto a esta, se transporta a los tejidos. La captación de O_2 por el sistema respiratorio se regula, entre otros factores, por la disponibilidad de O_2. En condiciones de hipoxia (como, por ejemplo, durante la exposición aguda a grandes alturas), la frecuencia respiratoria se incrementa en respuesta a la disminución de la tensión de O_2 en la sangre (PO_2). En los últimos años se ha demostrado que en este sistema de regulación fisiológica, los cambios en la PO_2 arterial se detectan por un tipo especial de canal de K^+ que se expresa en las células quimioceptoras del cuerpo carotídeo (células glómicas) y cuya actividad se regula por los cambios en la concentración de O_2 en el medio extracelular. Experimentos recientes sugieren que los canales de K^+ sensibles a O_2 no se encuentran restringidos al cuerpo carotídeo sino que se expresan en otros tejidos donde están involucrados en las respuestas fisiológicas y fisiopatológicas a la hipoxia. En este artículo se describen las características generales de los canales de K^+ sensibles a O_2 y de los mecanismos que podrían participar en la interacción entre el O_2 y la estructura oligomérica del canal iónico. Se discute además de forma breve el significado funcional de la regulación de canales iónicos por los cambios de PO_2.

Caracterización de los canales sensibles a oxígeno en los quimioceptores arteriales

Aunque la función quimioceptora del cuerpo carotídeo se conoce desde hace casi un siglo[1,2], los mecanismos implicados en la detección de los cambios de PO_2 se han mantenido oscuros. En las últimas décadas ha existido un acuerdo general en que las células glómicas, o de tipo I, las más abundantes en el órgano, son los elementos fundamentales en el proceso de transducción sensorial. Estas células segregan varios transmisores en respuesta a la hipoxia que estimulan las fibras nerviosas aferentes del nervio del seno, que a su vez son las que envían la información sensorial al sistema nervioso central[3-5]. Una investigación desarrollada recientemente en varios laboratorios ha demostrado que las células glómicas contienen canales iónicos dependientes de potencial para Na^+, Ca^{2+} y K^+ y que, como otras células excitables, pueden generar potenciales de acción de forma repetitiva[6-8]. La característica electrofisiológica más importante de las células glómicas es que la corriente de K^+ se inhibe reversiblemente en respuesta a la disminución de la PO_2[7,9-12]. Este fenómeno se ilustra en la figura 1 con registros de corriente macroscópica de K^+ tras el bloqueo del resto de los canales dependientes de potencial. La corriente de potasio tiene un umbral de activación a aproximadamente 40 mV y se inactiva casi completamente en 300 ms[8,12]. En promedio, la exposición a PO_2 entre 10 y 30 mmHg produce una inhibición de la corriente del 30-40%. La modulación de la corriente de K^+ por los cambios de la PO_2 es selectiva (las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} permanecen inalteradas) y se puede observar sin atenuación varias veces en una misma célula[7,12].

Como en otras células excitables, la corriente macroscópica de K^+ de las células glómicas se debe a la actividad de varias subpoblacio-

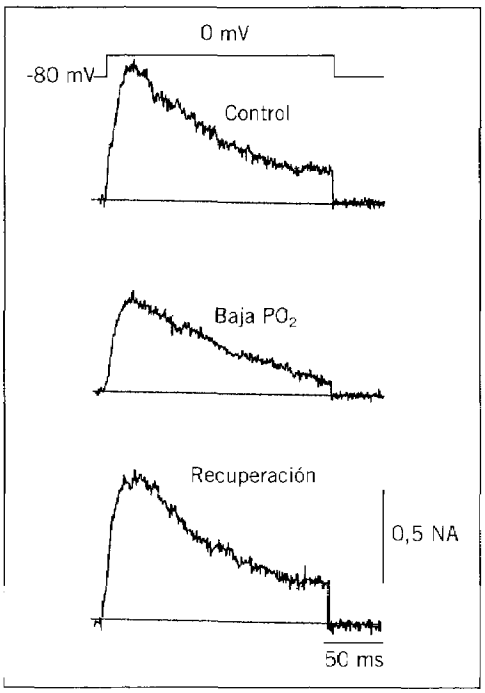

Fig. 1. Corriente de potasio regulada por O_2 en células glómicas. Las corrientes se registraron durante un pulso de potencial desde –80 hasta 0 mV con la configuración de «célula completa» de la técnica de patch clamp. *La composición de las soluciones fue la siguiente. Externa: 140 ClNa, 2,7 ClK, 2,5 Cl_2 Ca, 2 Cl_2Mg, 10 Hepes, 5 glucosa, 1 mM tetrodotoxina, pH: 7,3; interna: 30 ClK 80 glutamato-K, 20 FK, 10 Hepes, 10 EGTA, 2,5 Cl_2Mg, pH: 7,2. La solución externa se equilibró bien con aire (control y recuperación, PO_2=145 mmHg) o con N_2 (baja PO_2=10-20 mmHg). Temperatura=22-25 °C. Modificada de Benot AR et al*[19].

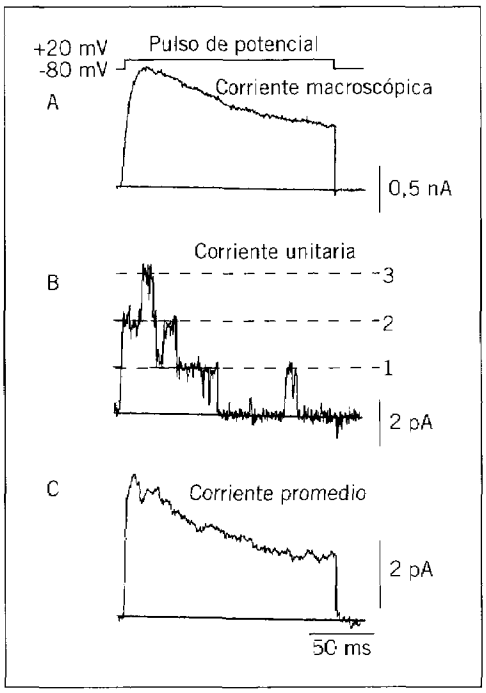

Fig. 2. Curso temporal de la corriente macroscópica de K^+ y de la corriente unitaria a través de los canales de K^+ sensibles a O_2. A: corriente macroscópica durante una despolarización de –80 hasta +20 mV; B: corrientes unitarias en un parche con 3 canales en la configuración outside-out *utilizando el mismo pulso de potencial; C: promedio de 23 barridos consecutivos similares a los que muestran en B. La composición de las soluciones es similar a la figura 1. Modificada de Benot AR et al*[19].

nes de canales dependientes de potencial. En células glómicas de conejo adulto se expresan al menos tres tipos distintos de canales de K^+ que difieren en su dependencia de Ca^{2+} y voltaje, conductancia unitaria y sensibilidad a los cambios de PO_2[13]. Existen los típicos canales de K^+ activados por Ca^{2+} (canales K_{Ca} de gran conductancia (aproximadamente 200 pS en concentraciones simétricas de 130-140 mM de K^+) similares a los que se observan en casi todas las células excitables. Junto a estos, también se pueden registrar canales de conductancia muy pequeña (unos 16 pS) que, aunque no estudiados con mucho detalle, no parecen ser dependientes de Ca^{2+}. Además de estos dos tipos de canales, insensibles a los cambios de PO_2, existe un tercer tipo de conductancia intermedia (unos 40 pS) y cuya probabilidad de apertura se incrementa con la despolarización y se inhibe con la disminución de la PO_2. Estos canales regulados por cambios en la PO_2 (de forma abreviada canales KO_2) se expresan en un número de aproximadamente 900 por célula y son los mayores responsables de las propiedades de la corriente macroscópica de K^+[13-15].

La relación entre los canales KO_2 y la corriente macroscópica de K^+ se ilustra en la figura 2. En el panel A se muestra un registro de corriente de K^+ durante un pulso de potencial que despolariza la membrana desde el potencial mantenido de –80 hasta +20 mV. Tras la escisión de un parche de membrana que con-

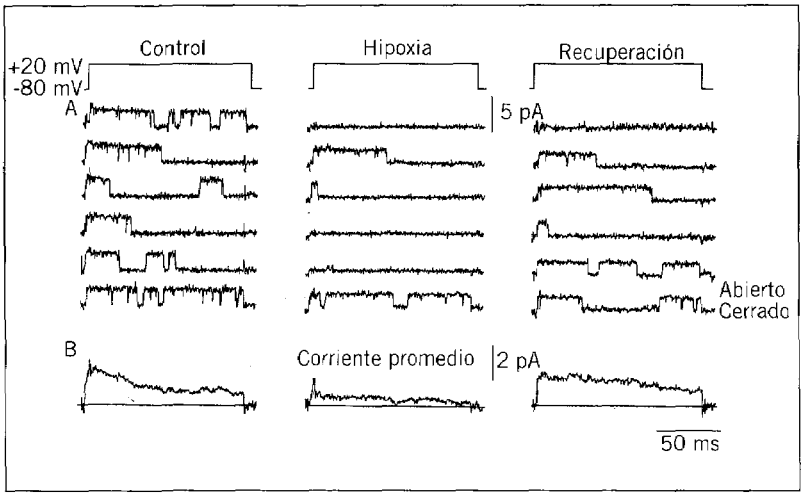

Fig. 3. Modulación de los canales KO_2 por la tensión de O_2. A: barridos representativos obtenidos por despolarizaciones desde −80 hasta +20 mV en un parche escindido en la configuración outside-out *que contenía como máximo un solo canal abierto. Los registros se realizaron en una solución externa control (PO_2=145 mmHg) y durante el paso de la PO_2 desde 145 a 80 mmHg (hipoxia). Los pulsos se aplicaron cada 5 s; B: corrientes promedio de 15 a 30 barridos consecutivos de corriente unitaria en las diferentes condiciones experimentales. Las soluciones utilizadas son las mismas que en la figura 1. Modificada de Benot AR et al[19].*

tenía 3 canales, la aplicación de un pulso de las mismas características produce la apertura y cierre de los canales en el parche (panel B). Cuando cada uno de los canales se abre contribuyen con pulsos de corriente de unos 1,8 pA de amplitud. Los canales se abren preferentemente al inicio del pulso y posteriormente entran en un estado inactivado. En el panel C se muestra el promedio de 37 registros de actividad unitaria donde se aprecia claramente la inactivación de los canales con un curso temporal muy similar al de la corriente macroscópica. El efecto más aparente de la hipoxia sobre los canales KO_2 es una disminución reversible de la probabilidad de apertura[13,14]. Este hecho se ilustra en la figura 3A con 3 grupos de registros obtenidos de un parche escindido (donde se aprecia como máximo un solo canal abierto) sometido a despolarizaciones sucesivas desde −80 a +20 mV. El parche de membrana fue expuesto a soluciones equilibradas con aire (control y recuperación) o con una mezcla de aire y N_2 (hipoxia). Los promedios de 15 a 30 barridos consecutivos registrados en las diferentes condiciones experimentales se muestran en la figura 3B. La probabilidad de apertura del canal (p_o=0,61) decreció de forma marcada tras la exposición a una PO_2 baja (p_o=0,28) con vuelta a los valores controles (p_o=0,74) tras la restauración de la PO_2 normal. En el rango entre 0 y +30 mV la exposición a hipoxia (aproximadamente 10 mmHg) conduce a un incremento de 1,5-2 veces en la probabilidad de apertura. Los registros de la figura 3A también demuestran que los cambios en la PO_2 no afectan a la amplitud de la corriente unitaria.

Interacción entre el oxígeno y los canales de K^+

El estudio detallado de la interacción del O_2 con los canales de K^+ indica que la disminución de la probabilidad de apertura en condiciones de hipoxia se debe a modificaciones de propiedades cinéticas bien definidas[15], lo que sugiere que la tensión de O_2 influencia la conformación de dominios específicos de la molécula. Cambios en la PO_2 podrían regular el estado *redox* de grupos tiol, localizados bien en la molécula del canal KO_2 o en un sensor asociado formando parte de la misma estructura oligomérica (véase posteriormente), que determinan sus propiedades cinéticas. Algunos antecedentes que sustentan esta hipótesis son la regulación de la inactivación en algunos canales de K^+ recombinantes dependiendo del estado *redox* de residuos cisteína existentes en el dominio aminoterminal de la molécula[16,17], o la existencia de un sitio de regulación *redox* en el complejo receptor NMDA-canal[18]. Para contrastar estas ideas se ha estudiado el efecto de antioxidantes sobre los canales KO_2. En la figura 4 se comparan el efecto de la hipoxia y de un agente reductor como el glutatión reducido (GSH) en un mismo parche de membrana es-

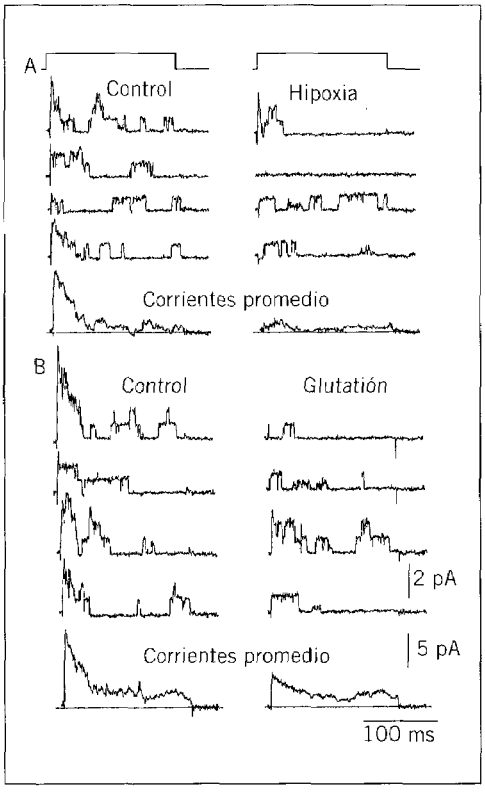

Fig. 4. Exposición de un mismo macroparche de membrana con un número máximo de 6 canales simultáneamente abiertos a hipoxia (PO_2=10-20 mmHg) y a glutatión reducido (GSH, 1 mM). Los pulsos se aplicaron en todos los casos desde –80 hasta +20 mV y con intervalo de 20-30 s. Las corrientes promedios se obtuvieron con 10-20 barridos individuales. Se han utilizado las mismas soluciones que en la figura 1. Modificada de Benot AR et al[19].

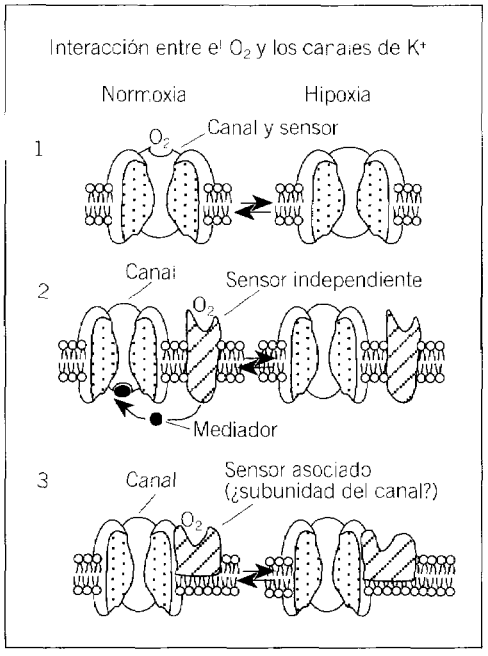

Fig. 5. Representación esquemática de los diferentes mecanismos propuestos para explicar la modulación de los canales de K^+ por los cambios en la PO_2. Modificada de López Barneo J[21].

cindido (en la configuración *inside-out*) que mostraba la actividad como máximo de 6 canales simultáneamente abiertos. En condiciones de normoxia, los canales se abren e inactivan durante el pulso con un curso temporal que, como se ilustra en el promedio de la figura, es parecido al de la corriente macroscópica de K^+ regulada por O_2. Tras la exposición a hipoxia se produce una disminución marcada de la actividad de los canales y, en consecuencia, una atenuación drástica de la corriente promedio. Después de la recuperación de la actividad de los canales en la solución normóxica, la aplicación de GSH a la cara interna de la membrana (a concentraciones entre 1 y 5 mM) da lugar a una reducción de la probabilidad de apertura sin modificar la conductancia unitaria. Al igual que el GSH, otros agentes reductores como el ditiotreitol (DTT) también inhiben la actividad de los canales regulados por oxígeno. Estos datos sugieren que el efecto último de la hipoxia podría ser la reducción de grupos tiol de la estructura oligomérica del canal KO_2[19].

La regulación de los canales de K^+ por O_2 ocurre en células a las que se aplicó la técnica de *patch-clamp*, lo que conlleva la diálisis de los componentes solubles del citosol, así como en parches de membrana escindidos. Por lo tanto, es muy probable que la interacción entre el O_2 y los canales de K^+ ocurra a través de un sensor intrínseco de la membrana plasmática que, o bien forma parte de la estructura oligomérica de los canales, o bien es una molécula que está estrechamente asociada a estos. Los diferentes mecanismos propuestos para explicar cómo la PO_2 influye en la función de los canales iónicos se resumen en la figura 5[20,21]. Desde el punto de vista biofísico, los canales de K^+ regulados por O_2 pertenecen a la familia de

canales de rectificación retardada y, por lo tanto, es posible (panel 5A) que el oxígeno interaccione con una región especial de las 4 subunidades α que forman su estructura básica. El O_2 podría ligarse reversiblemente a complejos de coordinación formados por metales unidos a la proteína como ocurre en otras moléculas[22]. Esta idea es lógicamente especulativa aunque podrá verificarse una vez que se conozca la secuencia de aminoácidos y otras propiedades del canal KO_2. Una posibilidad alternativa es que el O_2 sea detectado por un sensor localizado en la membrana cerca del canal iónico. Este sensor podría ser independiente (fig. 5B) o asociado a la molécula del canal (fig. 5C). Este último caso, en el que la interacción sensor-canal es directa u ocurre en la fase de la membrana, es el más probable porque los posibles mediadores hidrosolubles (que se lavan en parches de membrana escindidos) o proteínas G parecen no estar implicados en la modulación de los canales de K^+ por oxígeno[13,14]. Se ha postulado que el sensor de O_2 podría ser una hemoproteína ya que se sabe que desde bacterias hasta células de mamíferos existen muchos ejemplos de enzimas sensibles al O_2 que contienen un grupo prostético hemo[23,24]. Aunque las evidencias son fragmentarias, algunos autores han propuesto que tanto en el cuerpo carotídeo[25] como en los quimioceptores de las vías aéreas[26] el sensor de O_2 es un citocromo b asociado a la enzima NADPH-oxidasa. Independientemente de su naturaleza molecular, la idea de un sensor asociado al canal es atractiva porque permite imaginarse los canales sensibles a O_2 como una familia amplia de moléculas capaces de coexpresarse con una subunidad sensora de O_2, de forma similar a como se expresan las subunidades β y γ con las subunidades fundamentales α de los canales de sodio y calcio[21]. Recientemente, se han descrito varias subunidades β asociadas a canales de K^+ que, en algún caso, regulan el curso temporal de la inactivación dependiendo de su estado de oxidación-reducción[27]. Por lo tanto, el tipo molecular y biofísico de canal de K^+ regulado por oxígeno podría variar en células distintas, o en las mismas células en diferentes etapas del desarrollo[21].

Implicaciones funcionales y distribución de los canales sensibles a oxígeno

En las células glómicas los canales KO_2 tienen un significado funcional directo ya que confieren a estas sus propiedades quimioceptoras. La inhibición de los canales de K^+ en respuesta a la hipoxia da lugar a un aumento de la excitabilidad de las células glómicas con el consiguiente aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción. Ya que durante cada potencial de acción se produce entrada de Ca^{2+} a través de canales de calciodependientes de potencial[8], el efecto neto de una bajada de la PO_2 es el incremento de Ca^{2+} citosólico, lo que dispara la secreción de los transmisores que activan a las fibras nerviosas aferentes del cuerpo carotídeo[20,28]. Estos principios generales se ilustran en el esquema de la figura 6, donde se resumen los procesos celulares básicos involucrados en la transducción sensorial en el cuerpo carotídeo. El flujo de información dentro del órgano completo en condiciones fisiológicas, aunque quizá determinado por la secuencia de episodios que se describen en el esquema de la figura, es casi seguro que sufre ajustes y modificaciones debido a interacciones autocrinas y paracrinas[20].

Aunque en los experimentos iniciales sobre la corriente de K^+ regulada por oxígeno se demostró su especificidad tisular, ya que no se encontró en otras células estudiadas (neuronas del ganglio petroso y de los núcleos del septo, células SIF de los ganglios simpáticos y células tipo II del cuerpo carotídeo)[10,12], recientes observaciones indican que los canales de K^+ sensibles a O_2 se expresan en otros tejidos. Al menos 2 grupos de investigadores han descrito que la corriente de K^+ macroscópica de miocitos aislados de la arteria pulmonar se inhibe en respuesta a la disminución de la PO_2[29,30]. Esta respuesta contribuye a la vasoconstricción pulmonar inducida por la hipoxia que, además de favorecer un balance adecuado entre la ventilación y la perfusión pulmonar, es la mayor causa de hipertensión pulmonar en pacientes con falta de adaptación a grandes alturas («mal agudo de montaña») o con enfermedades cardíacas de origen pulmonar. Se ha observado también una corriente de K^+ regulada por O_2 en células de los cuerpos neuroepiteliales del pulmón las cuales son excitables y tienen propiedades electrofisiológicas muy parecidas a las de las células glómicas[26]. Los cuerpos neuroepiteliales (órganos de pequeño tamaño inervados y distribuidos por toda la mucosa de las vías aéreas) posiblemente complementan los quimioceptores arteriales convencionales, tales como el cuerpo carotídeo, en la homeostasis de la respiración durante la transición de la vida fetal a la neonatal[26]. Estos datos indican que la significación funcional de los canales regulados

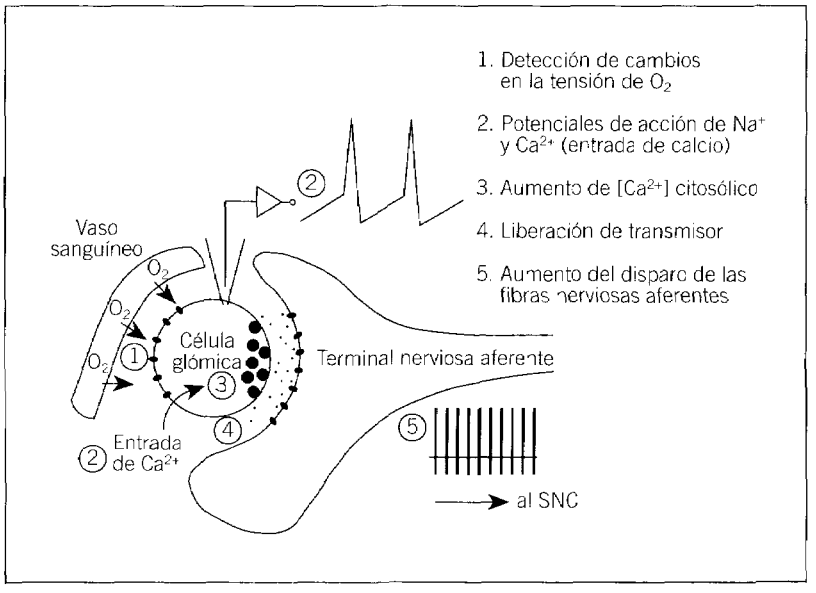

Fig. 6. Etapas fundamentales en el proceso de transducción de los cambios de tensión de O_2 en el cuerpo carotídeo. Modificada de López Barneo J et al[20].

por O_2 es más amplia que la supuesta inicialmente.

Conclusiones

Al igual que en otras modalidades sensoriales, los canales iónicos también participan en la transducción de los cambios de O_2. Los canales de K^+ sensibles a O_2 se expresan en diferentes tejidos donde la detección de las modificaciones en la tensión de O_2 tiene una relevancia funcional directa. Dado que los diferentes tipos de canales iónicos son ubicuos y la obvia ventaja biológica que supone mantener los valores de O_2 bajo un control estricto, es de esperar que en un futuro cercano se demuestre que los canales regulados por O_2 están ampliamente distribuidos en órganos y tejidos y que participan en numerosas funciones celulares dependientes de O_2, en condiciones normales y en circunstancias patológicas.

Agradecimiento

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con varios colegas a los que deseo expresar mi gratitud por su continuo estímulo y apoyo. Los experimentos se realizaron con financiación de la Dirección General de Investigación Científica y Técnica, Junta de Andalucía y Comunidad Europea.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Castro F. Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidinenne (glomus caroticum) de l'homme et des mamiféres, et sur un nouveau systeme d'innervation autonome du nerf glossopharyngien. Trav Lab Invest Biol Univ Madrid 1926; 24: 365-432.
2. Heymans C, Bouckaert JJ, Dautrebande L. Sinus carotidien et reflexes respiratoires. II. Influences respiratoires reflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'annhydride carbonique, de l'ion hydrogene et de l'anoxemie: sinus carotidiens et echanges respiratoires dans le poumons et au dela des poumons. Arch Internat Pharmac Ther 1930; 39: 400-408.
3. Fidone SJ, González C. Initation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. En: Fishman AP, editor. Handbook of Physiology: The Respiratory System II. Bethesda: American Physiological Society 1986; 313-362.
4. Fishman MC, Greene WL, Platika D. Oxygen chemoreception by carotid body cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 1.448-1.450.
5. González C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. Trends Neurosci 1992; 15: 146-153.
6. Duchen MR, Caddy KWT, Kirby GC, Patterson DL, Ponte J, Biscoe TJ. Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. Neuroscience 1988; 26: 291-311.
7. López Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. Chemotransduction in the carotid body: K^+ current modulated by PO_2 in type I chemoreceptor cells. Science 1988; 242: 580-582.

8. Ureña J, López-López JR, González C, López-Barneo J. Ionic currents in dispersed chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. J Gen Physiol 1989; 93: 979-999.
9. Delpiano MA, Hescheler J. Evidence for a PO_2-sensitive K^+ channel in the type I cell of the rabbit carotid body. FEBS Lett 1989; 249: 195-198.
10. Stea A, Nurse CA. Whole-cell and perforated patch recordings from O_2—sensitive rat carotid body cells grown in short— and long-term culture. Pflügers Arch 1991; 418: 93-101.
11. Peers C. Hypoxic supression of K^+ currents in type I carotid body cells: Selective effect on the Ca^{2+}-activated K^+ current. Neurosci Lett 1990; 119: 253-256.
12. López-López JR, González C, Ureña J, López-Barneo J. Low PO_2 selectively inhibits K^+ channel activity in chemoreceptor cells of the carotid body. J Gen Physiol 1989; 93: 1.001-1.015.
13. Ganfornina MD, López-Barnero J. Potassium channel types in arterial chemoreceptor cells and their selective modulation by oxygen. J Gen Physiol 1982; 100: 401-426.
14. Ganfornina MD, López-Barneo J. Single K^+ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O_2 tension. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 2.927-2.930.
15. Ganfornina MD, López-Barneo J. Gating of O_2-sensitive K^+ channels of arterial chemoreceptor cells and kinetic modifications induced by low PO_2. J Gen Physiol 1992; 100: 427-455.
16. Ruppersberg JP, Stocker M, Pongs O, Heinemann SH, Frank R, Koenen M. Regulation of fast inactivation of cloned mammalian $I_K(A)$ channels by cysteine oxidation. Nature 1991; 352: 711-714.
17. Vega-Sáenz de Miera E, Rudy B. Modulation of K^+ channels by hydrogen peroxide. Biochem Biophys Res Comm 1992; 186: 1.681-1.687.
18. Aizenman E, Lipton SA, Loring RH. Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. Neuron 1989; 2: 1.257-1.263.
19. Benot AR, Ganfornina MD, López-Barneo J. Potassium channel modulated by hipoxia and the redox status in glomus cells of the carotid body. En: Weir EK et al, editores. Ion Flux in Pulmonary Vascular Control. Nueva York: Plenum Press, 1993; 177-187.
20. López Barneo J, Benot AR, Ureña J. O_2 sensing and the electrophysiology of arterial chemoreceptor cells. News Physiol Sci 1993; 8: 191-195.
21. López Barneo J. Oxygen-sensitive ion channels: how ubiquitous are they? Trends Neurosci 1994; 17: 133-135.
22. Karlin KD. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. Science 1993; 261: 701-708.
23. Monson EK, Weinstein M, Ditta GS, Helinski DR. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a hemebinding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4.280-4.284.
24. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science 1988; 242: 1.412-1.415.
25. Cross AR, Henderson L, Jones ATG, Delpiano MA, Hentschel J, Acker H. Involvement of an NAD(P)H oxidase as a PO_2 sensor protein in the rat carotid body. Biochem J 1990; 272: 743-747.
26. Youngson C, Nurse C, Yeger H, Cutz E. Oxygen sensing in airway chemoreceptors. Nature 1993; 365: 153-155.
27. Heinemann, SH. Comunicación personal.
28. Ureña J, Fernández-Chacón R, Álvarez de Toledo G, López-Barneo J. Relationship between dopamine release and cytosolic calcium in dispersed glomus cells. [resumen]. Biophys J 1994; 66: 172.
29. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. Am J Physiol 1992; 262: C882-C890.
30. Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesentery arterial myocytes. Am J Physiol 1992; 264: L116-L123.

DISCUSIÓN

J. García-Sancho: ¿Podría especular sobre la estructura del sensor de oxígeno?, ¿cuáles son los efectos del cianuro, del monóxido de carbono?, ¿puede el óxido nítrico interactuar con el canal?

J. López Barneo: El efecto del cianuro sobre el canal directamente en parche escindido bien caracterizado y bien aislado no se ha estudiado. En cuanto al efecto del monóxido de carbono, los Dres. C. González y J.R. López-López llevaron a cabo un experimento hace poco tiempo en el que muestran que es muy similar al oxígeno. El efecto del óxido nítrico ha sido estudiado también por otros grupos y los datos preliminares sugieren que el efecto es parecido al del oxígeno. Esto me lleva a especular que este canal podría expresarse en el cerebro y actuar como receptor de CO y de NO. Estos iones parece que actúan como transmisores en el sistema nervioso central.

F. Sala: Me gustaría que comentara de una forma más detallada el esquema de estados cinéticos que ha presentado, y que indicara dónde interviene ahí el oxígeno, si modifica sensibilidad de voltaje, o qué es lo que realmente hace.

J. López Barneo: El canal regulado por oxígeno no es un canal ligandodependiente, sino que

es un canal voltajedependiente clásico y típico. Para comprender cómo el oxígeno interacciona con el canal hicimos bastantes experimentos, enormemente costosos en tiempo, intentando determinar si haciendo un modelo simple de canal voltajedependiente el cambio de la PO_2 produce una variación inespecífica, altera todas las constantes cinéticas, o su efecto podría explicarse por modificaciones de constantes cinéticas específicas; esto es importante a la hora de comprender, no sólo a nivel biofísico, sino también a nivel fisiológico cómo funciona el canal. Hemos visto que la falta de oxígeno hace mucho más rápida la inactivación, y aumenta la primera latencia de la apertura del canal, pero el estado abierto y todas las transiciones cercanas al estado abierto no se ven afectadas por la hipoxia, y lo mismo hace el glutatión. El glutatión reducido produce dos alteraciones fundamentales, hace que el canal se abra más lentamente (los que se abren) y que se inactiven más rápidamente aquellos que se abren. Y, por último, una tercera alteración importantísima es que el número de canales que se abren disminuye, porque pasan directamente de un estado cerrado a uno inactivado sin pasar por el abierto. Son las tres alteraciones fundamentales.

W. Buño: En cuanto a la cinética, parece ser que pasa de cuatro compuertas a tres compuertas, ¿sería eso la modificación de la cinética?

J. López Barneo: Puede haber otra, pero nuestro modelo cinético asume que el canal está en un estado cerrado, lejano del abierto. Al menos hay tres estados cerrados antes del abierto, y que lo que hace el oxígeno es llevarlo a otro estado que llamamos todavía más cerrado, más lejano del abierto. Pero esa última transición no es voltajedependiente, sino que depende exclusivamente del oxígeno.

W. Buño: Mi otra pregunta se refiere a que el glutatión actúa dentro y no fuera, así que eso me hace pensar que el sensor está mirando hacia dentro en la membrana.

J. López Barneo: En efecto, el glutatión hace muchas cosas en esta célula, y además sobre todos los canales, pero sobre los canales de potasio regulados por oxígeno se parece al efecto de la hipoxia solamente si se aplica por dentro.

M. Criado: El efecto de glutatión es reversible, y me pregunto si han realizado experimentos con un agente alquilante que irreversiblemente modifique estos sitios que quizá son cisteínas.

J. López Barneo: No hemos probado con agentes que son irreversibles, fundamentalmente por nuestro prurito de que ya que la regulación de PO_2 es muy reversible y regula muy finamente este canal, hiciésemos lo mismo con agentes reductores. Hemos utilizado además del glutatión, el ditiotreitol (DTT) con el mismo efecto. Uno de los experimentos que estamos haciendo es tratar la cara interna de la membrana con tripsina para destruir el supuesto sensor si lo hay asociado a una subunidad beta o la supuesta cisteína que podría formar parte de los dominios carboxilo o amino del canal, y observar si se modifican sus características cinéticas y si sigue regulado o no por oxígeno.

F. Barros: Partiendo de la base de que usted postula la posibilidad de que una subunidad regule, podría tratarse de una subunidad del tipo beta que regulara otros canales de potasio y esto ser importante para el mantenimiento del potencial basal y la tasa de espigueo.

J. López Barneo: Hemos buscado en las células tipo 1 del conejo adulto la posibilidad de que otros canales sean regulados por potasio, y no lo hemos visto. Eso no descarta que no haya canales de tipo de rectificación como el que usted estudia, que regulen el potencial de membrana, y que también sean regulados por los cambios de la PO_2. No hemos hecho una búsqueda exhaustiva de canales que no sean voltajedependientes pero en la que hemos hecho no hemos visto ninguna regulación por los cambios de PO_2, lo cual no quiere decir que no la haya. Por esa razón, creemos que la regulación de este canal por el oxígeno puede explicar la función quimiotraductora de estas células si imaginamos estas células en un contexto fisiológico en donde con un potencial cercano a los 40-50 mV, que parece ser que tienen, están disparando de forma repetitiva y son osciladores intrínsecos. En esas circunstancias la sensibilidad de un canal voltajedependiente al oxígeno toma todo su valor, puesto que va a regular finalmente la frecuencia de disparo. Eso es muy difícil demostrarlo porque en células en cultivo no todas ellas son osciladores intrínsecos. Al parecer algunas están demasiado polarizadas y no disparan, lo cual hace que no sean sensibles a la hipoxia en cultivo.

C. González: Mi pregunta era exactamente esta; siempre que presentamos los resultados de nuestro grupo la pregunta de los expertos en cuerpos carotídeos es cómo un canal con un umbral de activación macroscópico de

–40 mV es el *trigger* de la despolarización de las células.

J. LÓPEZ BARNEO: En mi opinión esta pregunta parte de un postulado que no se ha demostrado. Parto de otra premisa, y es que aquí no hay potencial receptor, sino que lo que hay son células que por las características de su conductancia iónica a un potencial de 50 a 40 mV van a ser osciladores intrínsecos y eso espero que algún día podamos demostrarlo, al menos en el conejo. Mi argumentación cuando se me formula esta pregunta es ¿quién ha mostrado en el cuerpo carotídeo de cualquier especie un canal que no sea voltajedependiente y que sea regulado por oxígeno de forma inequívoca? Que yo sepa, nadie.

C. GONZÁLEZ: En cualquier caso, este es un tema que sigue siendo controvertido.

M. VALDEOLMILLOS: Un comentario farmacológico sobre el efecto del cianuro en esta preparación. Creo que como fruto de un prejuicio de cuál podría ser el efecto de una baja presión de oxígeno sobre el acoplamiento estímulo-secreción en esta célula se pensó al principio que la baja presión de oxígeno podría tener un efecto sobre la mitocondria y, por lo tanto, el cianuro sería un buen modelo para estudiar el efecto de la hipoxia. Nosotros hicimos experimentos con cinauro y vimos que éste aumentaba la concentración intracelular de calcio como consecuencia de la liberación desde algún reservorio intracelular y por extensión pensamos que este sería el mecanismo de acción de la hipoxia. Creo que ahora se demuestra claramente que este no es el mecanismo fisiológico, sino que el calcio entra desde el espacio extracelular, y su entrada es consecuencia de la activación del sensor, que es el canal de potasio.

Canales de sodio sensibles a voltaje: implicaciones farmacoterapéuticas

J. Tamargo

Instituto de Farmacología y Toxicología. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad Complutense. Madrid.

Introducción

En los músculos auricular y ventricular y en el sistema His-Purkinje, la rápida velocidad de despolarización, responsable de la excitabilidad y velocidad de conducción, es debida a la activación de una corriente de entrada de Na a través de canales voltajedependientes (I_{Na})[1]. Por otro lado, el hallazgo de que la tetrodotoxina (TTX) acorta la duración del potencial de acción cardíaco (DPA), a concentraciones a las que no modifica la velocidad máxima de despolarización, sugiere que la I_{Na} también es responsable de la fase 2 del potencial de acción cardíaco[2].

Los fármacos antiarrítmicos previenen o suprimen las arritmias a concentraciones a las que no producen efectos adversos sobre el latido sinusal normalmente propagado. Los canales iónicos que participan en la regulación del potencial de acción cardíaco constituyen la diana de estos fármacos, de tal forma que, según la clasificación de Vaughan Williams[3], el grupo I, bloqueadores de los canales de Na, está constituido por fármacos muy heterogéneos que presentan en común su capacidad para bloquear la I_{Na} (tabla I).

Canales de Na cardíacos

Los canales de Na cardíacos y neuronales presentan muchas propiedades comunes[4,5], pero también importantes diferencias cinéticas y farmacológicas[4-6]. Los canales de Na cardíacos son resistentes a la TTX (TTX-R. KA aproximadamente 1 μM, mientras que en células nerviosas es de 0,05-10 nM), saxitoxina (STX) y μ-conotoxina, pero son 50-1.000 veces más sensibles a los anestésicos locales (FA del grupo I)[7-9]. En las células cardíacas, además, el bloqueo producido por la TTX se potencia al despolarizar la membrana y tras estimulación repetitiva y muestran una mayor sensibilidad al bloqueo por cationes divalentes del grupo II (Cd, Zn).

Estructura de la subunidad α del canal de Na cardíaco

El ADNc de la subunidad α de los canales voltajedependientes de Na cardíacos humanos es una proteína de 2.016 aminoácidos que muestra una identidad superior al 90% con el canal cardíaco de rata[10]. El canal contiene 4 dominios internos homólogos (I-IV), cada uno de los cuales exhibe 6 segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana (S1-S6) y una región S5-S6 o H5 que controla la selectividad iónica[8-11]. Experimentos de mutagénesis dirigida han demostrado que la región H5 es el poro del canal, mientras que la región S4, que contiene residuos cargados positivamente (X-X-[Arg o Lys])$_n$ en cada tercera posición, actuaría como sensor de voltaje[7,8]. En el miocardio existen diversas isoformas de este canal, algunas con una cinética más lenta que aquellas responsables de la rápida despolarización del potencial de acción[2,12,13]; estas isoformas son responsables de la I_{Na} que contribuye a mantener la fase 2 del potencial de acción cardíaco[2]. En el corazón de rata casi un 20% de los canales de Na exhiben una alta afinidad por la saxitoxina, lo

TABLA I
CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIARRÍTMICOS QUE BLOQUEAN LOS CANALES DE Na CARDÍACOS (GRUPO I)

Grupo IA	*Grupo IB*	*Grupo IC*
Quinidina	Lidocaína	Propafenona
Procainamida	Mexiletina	Flecainida
Disopiramida	Aprindina	Lorcainida
Ajmalina	Tocainida	Encainida
Cibenzolina	Pirmenol	Indecainida
Imipramina	Fenitoína	Recainam
	Morizicina	

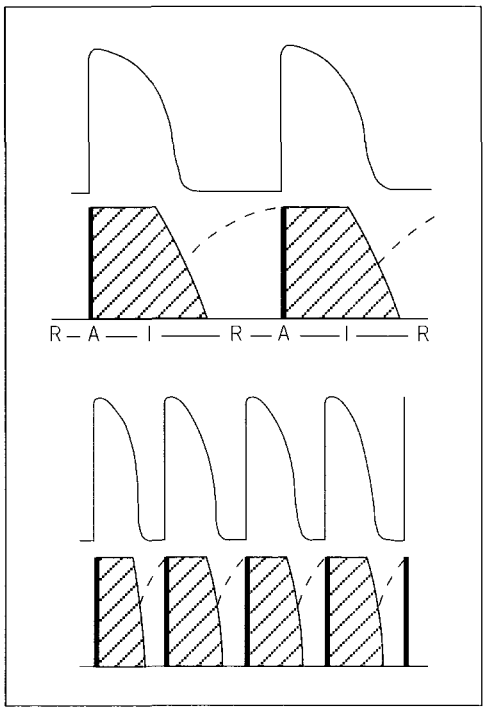

Fig. 1. Representación esquemática del potencial de acción cardíaco en ritmo sinusal y en presencia de una taquiarritmia. Durante el potencial de acción el canal de sodio adopta tres estados conformacionales: reposo-R, activo-A e inactivo-I. Durante la diástole los canales se encuentran en estado R, se activan brevemente durante la despolarización y a continuación pasan al estado I, en el que permanecen hasta que la célula se repolariza. En ritmo sinusal el intervalo diastólico es suficientemente largo para que los canales en estado I se recuperen y pasen al estado R antes de que llegue el siguiente potencial de acción sinusal. Durante la taquicardia aumenta el tiempo que el canal pasa en los estados A e I y el intervalo diastólico se acorta, lo que disminuye el tiempo que el canal tiene para reactivarse.

que confirma la importancia de otras isoformas distintas de la TTX-R predominante[10].

Muy recientemente, ha sido clonado un canal de Na cardíaco humano (nNav2.1 o hH1)[14]. La secuencia de 7,2 Kb es la primera de una nueva subfamilia de canales. El hH1 codifica una proteína de 1.682 aminoácidos, que muestra una homología del 46% con los canales de miocardio de rata. El tamaño de esta molécula es inferior al de otros canales de Na previamente descritos (1.819-2.018 residuos, 8,5-9,0 kb), lo que parece deberse a que la porción C-terminal es más corta en el hH1. Otra importante diferencia es que en el hH1 el número de residuos con carga positiva en los segmentos S4 de los dominios I, III y IV es inferior y en el IVS4 dos His han sido reemplazados por 2 Arg (residuos 1.355 y 1.367).

Características del bloqueo de los canales de Na

El bloqueo farmacológico de los canales de Na cardíacos es el mecanismo por el que los FA del grupo I suprimen las arritmias cardíacas. El bloqueo es un proceso voltaje y tiempodependiente y viene a su vez determinado por las características fisicoquímicas del FA, existiendo importantes diferencias según el fármaco analizado.

Durante el potencial de acción cardíaco el canal de Na adopta tres estados conformacionales[15,16]: uno conductor (abierto-O) y dos no conductores (cerrado-C, inactivo-I) (fig. 1). En la diástole, los canales se encuentran en reposo y predomina el estado C. Tras la aplicación de un pulso despolarizante o durante la fase 0 del potencial de acción cardíaco los canales se activan (R→O), permitiendo durante 1-2 ms la entrada de iones Na. La activación de los canales sigue un curso temporal sigmoidal, lo que indica que se mueven a través de varios (4-6) estados cerrados, no conductores, antes de que el canal se abra (C1 ... Cn→O) y uno o dos estados O. A continuación los canales se inactivan (O-→I) o se cierran (O→C), impidiendo la entrada de Na a su través, aun cuando la despolarización se mantenga. Si el canal pasa al estado C es posible su reapertura. El estado I predomina (O→I, R→I) a niveles despolarizados de potencial de membrana (durante las fases 2 y 3 del potencial de acción, tejidos isquémicos, hiperpotasemia)[15-18]. Cuando se analiza la corriente microscópica se puede observar que los canales de Na se abren brevemente (<1 ms), mientras que en la corriente macroscópica esta apertura dura varios ms. Ello implica que durante el pulso despolarizante algunos canales se abren-cierran antes y otros después del pico de la I_{Na} (C→O); además, otros pasan directamente al estado I (Cn→I) sin activarse. Estudios de canal único han demostrado que el proceso de inactivación presenta dos constantes de tiempo[19]. La fase rápida permite aperturas breves del canal (1-2 ms), pero no su reapertura; mientras que la fase lenta implica la reapertura prolongada del canal en forma de salvas[4]. Los canales que se encuentran en es-

TABLA II
AFINIDAD DE LOS FA DEL GRUPO I POR LOS ESTADOS ACTIVO E INACTIVO DEL CANAL DE Na Y SOBRE LA CONSTANTE DE TIEMPO DE REACTIVACIÓN (τ_{re}) DEL MISMO

Fármaco	*Activo (μM)*	*Inactivo (μM)*	τ_{re}
Quinidina	100	>100.000	4,7 s
Procainamida	28	1,0	2,3 s
Disopiramida	300	>100.000	2,2 s
Lidocaína	50	1,2	230 ms
Mexiletina	200	0,7	470 ms
Amiodarona	1.000	0,2	1,4 s
Propafenona	1	0,6	8,5 s
Flecainida	15	>100.000	15,5 s
Encainida	10	>100.000	20,3 s

tado I, para volver a activarse, deben volver previamente al estado R. Este paso (I→R), denominado recuperación de la inactivación o reactivación del canal de Na, es un proceso rápido (constante de tiempo o τ_{re}<30 ms), por lo que cuando llega el siguiente latido sinusal y dado que el intervalo diastólico es superior a 600 ms, la mayoría de los canales de Na están en estado R y disponibles para reactivarse.

El bloqueo voltaje y tiempodependiente de la I_{Na} producido por los FA puede explicarse en base a la hipótesis del receptor modulado[15,16,20-25], que propone que los FA del grupo I se unen a un receptor localizado en el canal de Na, estando moduladas su afinidad por este receptor y la cinética de asociación-disociación por el estado (O, I, R) en que el canal se encuentra. A concentraciones terapéuticas (rango μM) los FA presentan mayor afinidad por los estados O e I que por el estado R del canal y prolongan de forma característica la τ_{re} (tabla II)[16-25]. Los canales a los que se asocia el FA no permiten el paso de Na a su través y su dependencia de voltaje es desplazada a valores más negativos de potencial de membrana, lo que indica una mayor inhibición de la I_{Na} a niveles despolarizados de potencial de membrana.

Bloqueo tónico y frecuenciadependiente de la I_{Na}

En presencia de FA podemos observar dos tipos de bloqueo de la I_{Na}[16-25]: *1)* un *bloqueo tónico*, que representa el bloqueo que aparece durante la primera despolarización tras un largo período de reposo a potenciales de membrana negativos. A concentraciones terapéuticas, los FA apenas si producen bloqueo tónico (KRD ≃mM), lo que sugiere que a niveles negativos de potencial de membrana se disocian del canal, y *2)* si estimulamos de forma repetitiva la célula cardíaca la I_{Na} disminuye de forma progresiva hasta que esta alcanza un valor estable. Este *bloqueo frecuencia (uso)dependiente de la I_{Na}* (BFD) se debe a que durante la taquicardia los canales persisten más tiempo en los estados por los que los FA presentan afinidad (O e I) y a que los FA prolongan la τ_{re}. Puesto que la taquicardia acorta el intervalo diastólico, cuando llega el siguiente potencial de acción parte de los canales aún no se han reactivado (se encuentran como ID) y no permiten el paso de Na a su través; esta es la base de la búsqueda de FA selectivos, que inhiban la I_{Na} durante la taquicardia, pero que apenas la modifiquen en ritmo sinusal.

Los FA son básicos (pKa=8-9,5), por lo que a pH fisiológico (7,4) existen en dos formas: cargada-hidrofílica y no cargada-lipofílica. La forma cargada no bloquea cuando se administra a la superficie externa del canal, accediendo a este a través de una vía hidrofílica desde la superficie interna del poso sólo cuando el canal se activa, por lo que presentan un marcado BFD[7]. La forma lipofílica accede a su receptor por una vía hidrofóbica e interactúa con el canal independientemente del estado en que este se encuentre. La despolarización de la membrana, la acidosis y la hiperpotasemia favorecen la interacción de la forma cargada con su receptor y prolongan la τ_{re}[16-18], lo que explica por qué los FA que bloquean los canales de Na pueden inhibir más la I_{Na} en el miocardio isquémico que en el miocardio sano. La alcalosis, por el contrario, aumenta la forma no cargada y acelera la τ_{re}: de hecho, la alcalinización del medio interno se ha utilizado para tratar los efectos car-

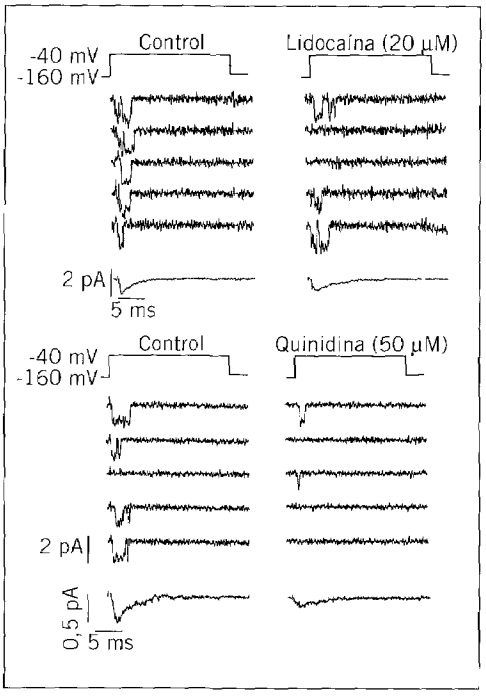

Fig. 2. Registros obtenidos en miocitos ventriculares de cobaya utilizando la configuración inside-out *de la técnica del parche de membrana. El potencial de membrana se fijó a −160 mV y se aplicó un pulso despolarizante hasta −40 mV durante 50 ms. Los paneles de la izquierda representan la situación control, mientras que los de la derecha muestran los efectos de quinidina (50 μM, panel superior) y de la lidocaína (20 μM).*

diodepresores de los bloqueadores de la I_{Na}[17].

En presencia de FA (lidocaína[26,27], quinidina[28], mexiletina, tocainida[22] y procainamida[29], la reactivación del canal de Na representa la disociación del fármaco desde RD→R e ID→I→R, acelerándose este proceso al hiperpolarizar la membrana. Despolarizaciones o repolarizaciones repetitivas también pueden acelerar la reactivación. Este proceso, denominado *desbloqueo por activación,* implica los pasos ID→RD→OD→O[30] y puede ser un importante mecanismo de disociación de los FA que presentan muy pobre desbloqueo en reposo. Durante la hiperpolarización los canales se desplazan de ID a RD y la posterior despolarización produce la transición de estado OD→O si la (OD)>>(O). Estas características explican por qué los FA producen mayor inhibición de la I_{Na} a frecuencias rápidas y en tejidos despolarizados.

Bloqueadores del estado activo frente a bloqueadores del estado inactivo del canal de Na

Existen importantes implicaciones clínicas dependiendo del estado del canal por el que los FA presentan mayor afinidad. En general, la tabla II muestra que los FA de los grupos IA e IC presentan mayor afinidad por el estado A y los del grupo IB la presentan por el estado I del canal de Na[16,21,23,30], si bien algunos (propafenona, procainamida) presentan afinidad por ambos estados.

FA que presentan una alta afinidad por el estado activo

Son fármacos como propafenona, diprafenona, prajmalina, quinidina, disopiramida o penticainida. En preparaciones multicelulares, estos FA bloquean la I_{Na} durante la fase 0 del potencial de acción cardíaco y no desplazan la curva de inactivación de la corriente. Con algunos bloqueadores del estado O (disopiramida, penticainida) o reactivación del BFD puede retrasarse al hiperpolarizar la membrana, lo que sugiere que el FA quedaría atrapado en el canal tras el cierre de las compuertas de activación[31]. Si la disociación del FA requiere la apertura del canal, la hiperpolarización disminuirá la probabilidad de apertura retrasando la disociación del FA del canal de Na. En miocitos cardíacos aislados el bloqueo es evidente tras aplicar pulsos despolarizantes de corta duración (1-2 ms), durante la apertura del canal, pero aumenta poco tras su cierre o al prolongar la duración del pulso, cuando aumenta el tiempo que el canal persiste en estado[32,33]. En *registros de canal único* se denomina bloqueo del estado O al que aparece al comienzo del pulso despolarizante, si bien este incluye tanto el bloqueo del estado O como el de los que preceden a la apertura del canal. Si el bloqueo aparece en una escala de tiempo similar a la de apertura del canal podemos ver (panel superior en la fig. 2) que estos fármacos acortan el tiempo medio de apertura, prolongan el tiempo hasta la primera apertura del canal y que el bloqueo se revierte al aumentar la $[Na]_o$[34]. Si la cinética del bloqueo es más rápida que el tiempo de apertura del canal podemos observar una reducción de la amplitud de la corriente atribuible a la dificultad para separar el artefacto capacitativo de

la corriente iónica. Esta dificultad, unida al corto tiempo de apertura del canal (< 1 ms) ha limitado el análisis de los FA que se unen al estado O del canal, incluso tras reducir la temperatura (15-17 °C) y la $[Na]_o$[32]. Otra alternativa ha sido aislar la transición C→O tras eliminar (α-quimiotripsina, pronasa, DPI201-106[35,36]) o retrasar la inactivación de la I_{Na} (batracotoxin-BTX[37]). En estas condiciones el canal presenta aperturas repetitivas, de larga duración, que son inhibidas por los bloqueadores del estado O de forma dosis y voltajedependiente.

Estos FA son más efectivos a frecuencias rápidas (taquicardias) y en tejidos hiperpolarizados, pero su efectividad disminuye en tejidos despolarizados-isquémicos en los que predomina el estado I. Dado que el tiempo que el canal permanece abierto es similar en todos los tejidos cardíacos y que su acción es independiente de la DPA, estos FA van a ser efectivos tanto en arritmias supraventriculares como ventriculares[16-24]. Algunos FA (quinidina, disopiramida, procainamida, imipramina, flecainida, encainida, propafenona) se unen muy lentamente al estado O del canal, precisando más de 10 latidos para que el BFD de la I_{Na} alcance valores estables[16,18,20-22]. También se disocian del canal lentamente, aumentando la τ_{re} desde 2-6 s (quinidina, disopiramida, procainamida, imipramina) hasta más de 8 s (flecainida, encainida, propafenona)[16-22,38-41]. La prolongación de la τ_{re} explica: *a)* su efectividad para suprimir las extrasístoles tempranas y tardías y las taquiarritmias lentas, y *b)* su incapacidad para discriminar entre ritmo sinusal (longitud del ciclo cardíaco ≤ 1 s) y taquicardia. En presencia de FA que prolongan de forma marcada la τ_{re} el siguiente potencial de acción excitará la célula cuando un número importante de canales se encuentre en estado ID no conductor, deprimiendo la velocidad de conducción intracardíaca y facilitando la aparición de arritmias por reentrada, incluso en pacientes en ritmo sinusal. Podemos, pues, concluir que el riesgo de producir efectos proarritmogénicos aumenta a medida que lo hace la τ_{re}[18,20,23].

Los FA con mayor afinidad por el estado inactivo

Son fármacos como lidocaína, mexiletina, tocainida o aprindina. En preparaciones multicelulares y en células aisladas, utilizando la configuración de célula entera, producen un bloqueo de la I_{Na} que aumenta progresivamente durante la fase 2 del potencial de acción cardíaco o con la duración del pulso despolarizante y desplazan la curva de inactivación de la I_{Na} en estado estable hacia valores más negativos, lo que indica que producen un mayor bloqueo a niveles despolarizados del potencial de membrana, cuando predomina el estado[16-22]. En estudios de canal único puede verse (panel inferior en la fig. 2) que no modifican la latencia hasta la primera apertura de los canales, ni el tiempo de apertura de los mismos y que el bloqueo no se revierte al aumentar la $[Na]_o$. La inactivación del canal de Na cardíaco está controlada a nivel de la unión citoplasmática entre los dominios homólogos III y IV ($L_{III/IV}$)[42], ya que la aplicación de anticuerpos policlonales contra esta región[43] y la supresión o la inserción de diversos aminoácidos a este nivel[42,44] alteran la inactivación del canal. Tras suprimir la inactivación rápida con α-quimiotripsina o toxinas, o tras la mutación de 3 aminoácidos localizados en $L_{III/IV}$ (IFM por QQQ), el bloqueo de la I_{Na} producido por la lidocaína desaparece.

El bloqueo de la I_{Na} producida por estos FA aumenta[16-25]: *a)* en tejidos despolarizados (isquémicos, hiperpotasemia), ya que en estas condiciones al final de la diástole un porcentaje de canales persisten en estado I. En fibras de Purkinje la concentración de lidocaína necesaria para inhibir la I_{Na} en un 50% varía entre 10 μM cuando el potencial de membrana es de −50 mV (inactivación completa de la corriente) y más de 0,3 mM cuando el potencial se fija a −120 mV[27]. En el miocardio isquémico aumenta la $[K]_o$, disminuye el pH celular (acidosis) y el potencial de membrana se despolariza, por lo que un importante número de canales se desplaza al estado I[45]. Sería, pues, de esperar, que los fármacos con gran afinidad por el estado I deprimieran más la I_{Na} en el miocardio isquémico que en el sano, normalmente polarizado; sin embargo, esta posibilidad se ve contrarrestada porque despolarización e isquemia prolongan la τ_{re}[17]; *b)* a frecuencias rápidas (taquicardia), ya que entonces aumenta el tiempo que el canal permanece en estado inactivo, y *c)* en tejidos que presentan una DPA más prolongada. El músculo ventricular y el sistema His-Purkinje presentan una DPA más prolongada que el músculo auricular, por lo que estos FA son más efectivos para suprimir taquiarritmias ventriculares que taquicardias supraventriculares; además, el bloqueo de la I_{Na} se potencia si se asocian a FA que prolongan la DPA (p. ej., amiodarona).

TABLA III
METABOLITOS DE LOS FA DEL GRUPO I

Fármaco	*Metabolito*	*Potencia*
Quinidina	3-hidroxiquinidina	1
Procainamida	N-acetilprocainamida	>1
Disopiramida	N-desisopropildisopiramida	0,5
Lidocaína	Glicinaxilidida	0,1
Amiodarona	N-desetilamiodarona	1
Aprindina	N-desetilaprindina	1
Propafenona	5-hidroxipropafenona	1,5
Encainida	O-demitilencainida	>1
	3-metoxi-O-demetilencainida	>1

Potencia: se considera que el bloqueo producido por el fármaco origen es 1.

Estos FA se asocian-disocian muy rápido del canal de Na (τ_{re}<0,5 s; tabla II), por lo que el ritmo sinusal cuando llega el siguiente potencial de acción la mayoría de los canales están en estado R y disponibles para ser activados[16-25]. Por ello, en ritmo sinusal no alteran la velocidad de conducción intracardíaca; sí la deprimen en presencia de frecuencias cardíacas rápidas (taquiarritmias) o cuando la velocidad de conducción se encuentra ya deprimida (isquemia, hiperpotasemia). Debido a la rápida aparición del bloqueo este alcanza valores estables en menos de 5 latidos, por lo que son muy efectivos para suprimir un aumento súbito de la frecuencia cardíaca (extrasístoles tempranas, aparición de taquiarritmias), pero poco efectivos frente a taquiarritmias lentas o extrasístoles tardíos[16-25].

Combinaciones de FA

El control de las arritmias cardíacas refractarias exige la combinación de 2 FA, que al unirse al mismo receptor podrían competir entre sí modificando su eficacia. La combinación de FA de cinética rápida (mexiletina, lidocaína, tocainida) con otros de cinética intermedia (quinidina, disopiramida) o lenta (propafenona, flecainida) podría producir un mayor bloqueo de la I_{Na} (sinergismo) y reducir la incidencia de reacciones adversas[18,23,46-49]. Por el contrario, la combinación de FA de cinética lenta e intermedia producirá una mayor depresión de la I_{Na} y de la velocidad de conducción aumentando el riesgo de efectos cardiodepresores y antiarrítmicos[18,20,21,23,30]. Cuando un FA de cinética lenta o intermedia produce un alto grado de bloqueo, la administración de un FA de cinética rápida podría ocupar el canal durante la despolarización reduciendo, al menos a ciertas frecuencias de estimulación, la cantidad de canales ocupados por el FA de cinética lenta (combinación antagonista). Ello ha sido utilizado para revertir la cardiotoxicidad de los FA con una τ_{re} muy prolongada.

La mayoría de los bloqueadores de los canales de Na se biotransforman en metabolitos activos que presentan una estructura química muy similar a la del fármaco origen, por lo que ambos pueden competir por el mismo receptor en el canal de Na. A veces los metabolitos pueden producir un bloqueo de la I_{Na} similar o más potente que el producido por el FA origen (tabla III). Si el bloqueo es más potente (p. ej., desipramina y 5-hidroxipropafenona), los metabolitos son responsables tanto de la acción antiarrítmica como de la depresión de la excitabilidad y velocidad de conducción previamente atribuidas al fármaco origen[50,51]. En general, los metabolitos con τ_{re} prolongada pueden ejercer interacciones sinergistas, mientras que los que presentan una τ_{re} corta pueden ejercer efectos antagonistas. A veces, el metabolito exhibe propiedades que no presenta en FA origen; la N-acetilprocainamida (NAPA), metabolito de la procainamida, no bloquea la I_{Na}, pero prolonga la DPA[52,53], por lo que potenciaría las acciones de la procainamida, que presenta afinidad por el estado I.

Puesto que la activación precede la inactivación del canal, sería de esperar que entre FA con efecto similar sobre la τ_{re} los bloqueadores del estado O puedan prevenir la asociación de aquellos que presentan una alta afinidad por el estado[20,21,23,30]. Esta asociación tiene lugar entre la lidocaína y su principal metabolito, la glicilxilidida, que presenta una alta afinidad por el estado A y cuando se acumula en tratamientos crónicos puede reducir la efectividad clínica de la lidocaína[54]. Esta es una posible estrategia para revertir la excesiva cardiodepresión produ-

cida por los FA con alta afinidad por el estado I.

Muchos bloqueadores de la I_{Na} presentan un punto de asimetría en su molécula y se comercializan como racematos, que contienen al menos dos enantiómeros, cuyas propiedades electrofisiológicas pueden ser similares o no a las del racemato. Aun cuando ambos enantiómeros bloqueen la I_{Na}, pueden presentar diferencias en la potencia y cinética con respecto al racemato. (R)-tocainida y (R)-mexiletina son más potentes que el enantiómero (S), siendo los responsables del bloqueo de la I_{Na}[18,46,47,55,56]; por el contrario, no parecen existir diferencias en el grado de bloque de la I_{Na} observado con FA de cinética lenta. Otras veces un enantiómero presenta propiedades no relacionadas con el bloqueo de la I_{Na}; así la (S)(+)-disopiramida inhibe la corriente de salida de K rectificadora tardía y prolonga la DPA[57].

De todo lo anterior se deduce que el estudio de un bloqueador de la I_{Na} debe incluir también la evaluación de sus metabolitos y racematos y las posibles interacciones entre los metabolitos y el FA del que proceden.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fozzard HA. Conduction of the action potential. En: Berne RM, editor. Handbook of Physiology. Vol. 1. The Heart. Bethesda, Maryland: Williams and Wilkins Co., 1975; 335-356.
2. Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Effect of tetrodotoxin on action potentials of the conducting system in the dog heart. Am J Physiol 1979; 236: H561-H567.
3. Vaughan Williams EM. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. J Clin Pharmacol 1984; 24: 129-147.
4. Patlak JB, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of adult rat heart. J Gen Physiol 1986; 86: 80-104.
5. Grant AO, Starmer CF. Mechanisms of closure of cardiac sodium channels in rabbit ventricular myocytes: single-channel analysis. Circ Res 1987; 60: 897-913.
6. Kunze DL, Lacerda AE, Wilson DL et al. Cardiac Na currents and the inactivating, reopening and waiting properties of single cardiac Na channels. J Gen Physiol 1985; 86: 691-719.
7. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland, M.A.: Sinauer, 1992.
8. Catterall WA. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. Physiol Rev 1992; 72 (Supl): 15-48.
9. Stühmer W. Structure-function of voltage-gated ion channels. Ann Rev Biophys Chem 1991; 20: 65-78.
10. Rogart RB, Cribbs LL, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW. Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart sodium channel isoform. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 8.170-8.174.
11. Noda M, Ikeda T, Suzuki T, Takeshima H, Takahashi T, Kuno M et al. Expression of functional sodium channels from cloned cDNA. Nature 1986. 322: 826-828.
12. Bkaily G, Jacques D, Sculptoreanu A, Yamamoto T, Carrier D, Viegneauit D et al. Apamin a highly potent blocker of the TTX-and Mn^{2+}-insensitive fast transient Na^+ current in young embryonic heart. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 25-39.
13. Satin J, Kyle JW, Chen M, Bell P, Cribbs LL, Fozzard HA, et al. A point mutation of TTX-resistant cardiac Na channels confers three properties of TTX-sensitive Na channels. Science 1992; 256: 1.202-1.205.
14. George AL Jr, Knittle TJ, Tamkun MM. Molecular cloning of an atypical voltage-gated sodium channel expressed in human heart and uterus: evidence for a distinct gene family. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4.893-4.897.
15. Hondeghem LM, Katzung BG. Time-and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. Biochim Biophys Acta 1977; 472: 373-398.
16. Hondeghem LM, Katzung BG. Antiarrhythmic agents: the modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs. Annual Rev Pharmacol Toxicol 1984; 24: 387-423.
17. Grant AO, Starmer CF, Strauss HC. Antiarrhythmic drug action: blockade of the inward sodium current. Circ Res 1984; 55: 427-439.
18. Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. New insights into the pharmacology of sodium channel blockers. Eur Heart J 1992; 13 (Supl F): 2-12.
19. Carmeliet E, Saikawa T. Shortening of the action potential and reduction of pacemaker activity by lidocaine, quinidine, and procainamide in sheep cardiac Purkinje fibers: an effect on Na or K currents. Circ Res 1982; 50: 257-272.
20. Tamargo J, Valenzuela C, Delpón E. Modulated receptor hypothesis: Selectivity and interactions of antiarrhythmic drugs. News Physiol Sci 1989; 4: 90-99.
21. Synders DJ, Bennett PB, Hondeghem LM. Mechanisms of drug-channel interaction. En: Fozzard HA, Haber E, Jennings R, Katz AM, Morgan HE, editores. The Heart and Cardiovascular System. Nueva York: Raven Press, 1992; 2.165-2.193.
22. Courtney KR. Review: Quantitative structure/activity relations based on use-dependent INa block and repriming kinetics in myocardium. J Mol Cell Cardiol 1987; 19: 318-330.
23. Hondeghem LM. Antiarrhythmic agents: modulated receptor applications. Circulation 1987; 75: 514-520.
24. Kodama I, Toyama J, Takanaka C, Yamada K. Block of activated and inactivated sodium channels by Class-I antiarrhythmic drugs studied by

using the maximum upstroke velocity (V_{max}) of action potential in guinea-pig cardiac muscles. J Mol Cell Cardiol 1987; 19: 367-377.
25. Campbell TJ. Kinetics of onset of rate-dependent effects of Class I antiarrhythmic drugs are important in determining their effects on refractoriness in guinea-pig ventricle, and provide a theoretical basis for their subclassification. Cardiovasc Res 1983; 17: 344-352.
26. Chen C-M, Gettes LS, Katzung B. Effect of lidocaine and quinidine on steady-state characteristics and recovery kinetics of $(dV/dt)_{max}$ in guinea-pig ventricular myocardium. Circ Res 1975; 37: 20-29.
27. Bean BP, Cohen CJ, Tsien RW. Lidocaine block of cardiac sodium channels. J Gen Physiol 1983; 81: 613-642.
28. Weld FM, Coromillas J, Rottman JN, Bigger JT. Mechanism of quinidine-induced depression of maximum upstroke velocity in ovine cardiac Purkinje fibres. Circ Res 1982; 50: 369-376.
29. Sada H, Kojima M, Ban T. Effect of procainamide on transmembrane action potentials in guinea-pig papillary muscles as affected by external potassium concentration. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1979; 309: 179-180.
30. Hondeghem LM. Molecular interactions of antiarrhythmic agents with their receptor sites. En: Zipes DP, Jalife J, editores. Cardiac electrophysiology. From cell to bedside. Filadelfia: Saunders Co., 1990; 865-872.
31. Carmeliet E. Activation block and trapping of penticainide, a disopyramide analogue, in the Na^+ channel of the rabbit cardiac purkinje fibers. Circ Res 1988; 63: 50-60.
32. Bennett PB. Mechanisms of antiarrhythmic drug action: block of sodium channels in voltage-clamped cardiac cell membranes. J Appl Cardiol 1987; 2: 463-488.
33. Grant AO, Wendt DJ. Block and modulation of cardiac Na^+ channels by antiarrhythmic drugs, neurotransmitters and hormones. TIPS 1992; 13: 352-358.
34. Valenzuela C, Bennett PB, Hondeghem LM. Stereospecific block of cardiac Na channels by bupivacaine [resumen]. Biophys J 1990; 57: 108.
35. Kohlhardt M, Fichtner H, Froebe U, Herzig JW. On the mechanism of drug-induced blockade of Na^+ currents: interaction of antiarrhythmic compounds with DP1-modified single cardiac Na^+ channels. Circ Res 1989; 64: 867-881.
36. Valenzuela C, Bennet PB. Gating of cardiac Na^+ channels in excised membrane patches after modification by a-chymotrypsin. Biophys J En prensa.
37. Hauang LM, Yatani A, Brown AM. The properties of batrachotoxin-modified cardiac Na channels, including state-dependent block by tetrodotoxin. J Gen Physiol 1987; 90: 341-360.
38. Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Electrophysiological interactions between mexiletine and propafenone in guinea pig papillary muscles. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 14: 351-357.
39. Delpon E, Valenzuela C, Tamargo J. Electrophysiological effects of the combination of mexiletine and flecainide in guinea pig ventricular fibres. Br J Pharmacol 1991; 103: 1.411-1.416.
40. Valenzuela C, Sánchez-Chapula J. Electrophysiological interactions between mexiletine-quinidine and mexiletine-ropitoin in guinea pig papillary muscles. J Cardiovasc Pharmacol 1989; 14: 783-789.
41. Delpon E, Valenzuela C, Tamargo J. Electrophysiological effects of CRE-1087 in guinea pig ventricular fibres. Br J Pharmacol 1992; 107: 515-520.
42. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 1989; 339: 597-603.
43. Vassilev PM, Scheuer T, Catterall WA. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. Science 1988; 241: 1.658-1.661.
44. Patton DE, West JW, Catterall WA, Goldin AL. Amino acid residues required for fast Na^+-channel inactivation. Charge neutralizations and deletions in the III-IV linker. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 10.905-10.909.
45. Gettes LS. Effects of ischemia on cardiac electrophysiology. En: Fozzard HA, Haber E, Jennings R, Katz AM, Morgan HE, editores. The heart and cardiovascular system. Nueva York: Raven Press, 1986; 1.317-1.341.
46. Woosley RL. Antiarrhythmic drugs. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1991; 31: 427-455.
47. Woosley RL, Funk-Brentano C. Overview of clinical pharmacology of antiarrhythmic drugs [resumen]. Am J Cardiol 1988; 61: 61-69.
48. Greenspan AM, Spielman SR, Horowitz LN. Combination antiarrhythmic drug therapy for ventricular tachyarrhythmias. PACE 1987; 9: 565-576.
49. Duff HS, Mitchell LB, Manyari D, Wyse DG. Mexiletine-quinidine combination: Electrophysiologic correlates of a favorable antiarrhythmic interaction in humans. J Amm Coll Cardiol 1987; 10: 1.149-1.156.
50. Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Tonic and phasic Vmax block induced by 5-hydroxypropafenone in guinea pig ventricular muscles. J Cardiovasc Pharmacol 1988; 12: 423-431.
51. Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Tamargo J. Electrophysiological effects of the combination of imipramine and desipramine in guinea pig papillary muscles. J Cardiovasc Pharmacol 1993; 21: 13-20.
52. Bagwell EE, Walle T, Drayer DE, Reidenberg MM, Pruett JK. Correlation of the electrophysiological and antiarrhythmic properties of N-acetyl metabolite of procainamide with plasma and tissue drug concentrations in the dog. J Pharmacol Exp Ther 1976; 197: 38-48.
53. Roden DM, Reele SB, Higgins S et al. Antiarrhythmic efficacy, pharmacokinetics and safety of N-acetylprocainamide in human subjects: comparison with procainamide. Am J Cardiol 1980; 46: 463-468.

54. Bennet PB, Woosley RL, Hondeghem LM. Competition between lidocaine and one of its metabolities, glycylxylidide, for cardiac sodium channels. Circulation 1988; 78: 692-700.
55. Pérez O, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Stereoselective effects of tocainide enantiomers on the electrophysiological characteristics of guinea pig ventricular muscles. Br J Pharmacol 1994. En prensa.
56. Sheldon RS, Cannon NJ, Nies AS, Duff HJ. Sterospecific interaction of tocainide with the cardiac sodium channel. Mol Pharmacol 1988; 33: 327-331.
57. Kidwell GA, Schaal SF, Muir WW. Sterospecific effects of dispoyramide enantiomer following pretreatment of canine Purkinje fibres with verapamil and nisoldipine. J Cardiovasc Pharmacol 1987; 9: 276-284.

DISCUSIÓN

M. HURLÉ: Tras su exposición, me parece que la clasificación de los antiarrítmicos del grupo 1 según su cinética o su afinidad por los distintos estados del canal pierde todo el sentido.

J. TAMARGO: Absolutamente, lo que sucede es que la comisión que se ha reunido para hacer la nueva clasificación ha realizado un mapa extraordinariamente complejo, porque lo que hemos intentado es tener en cuenta todos los los canales y son 11 de potasio, tres de calcio y uno de sodio, más las bombas, y los receptores. La clasificación de Vaughan Williams era una clasificación de acciones. En este momento no puede ser aceptada, es muy simple, muy didáctica, muy fácil de recordar, pero absolutamente falsa.

J. MARSAL: ¿Podría extenderse un poco más en lo que ha dicho sobre la no utilidad de los oocitos para el estudio de la expresión de estos canales?

J. TAMARGO: A lo que me refiero es que con los oocitos aparecen diversos problemas. Prefiero, si lo que se pretende es extrapolar al hombre una célula de mamífero, trabajar con células cardíacas humanas, pero es obvio que esto presenta problemas éticos muy importantes. La alternativa sería obtener una línea celular de mamíferos estable ya que el oocito tiene una gran hidrofobicidad, y eso en compuestos con un gran número de enlaces hidrofóbicos puede hacer que no haya una fijación y distribución del fármaco similar a la que cabría esperar en una célula cardíaca. Ya se ha conseguido secuenciar e insertar en una célula de mamífero un canal de potasio, pero no un canal de sodio ya que desgraciadamente no se consigue mantener la línea estable. Es decir, que en estos momentos el canal de sodio está clonado, está secuenciado, se ha insertado, pero no se ha conseguido expresar de forma estable en una célula de mamífero.

A.G. GARCÍA: He observado que no incluye la difenilhidantoína en el perfil que ha presentado. ¿Podría comentar el motivo?

J. TAMARGO: En el caso de la difenilhidantoína no la he incluido por dos motivos; en primer lugar, porque los americanos por más que nos la vendieron al comienzo de los setenta han dejado de utilizarla hace muchos años; la única indicación en la que la utilizaban era el tratamiento de las arritmias digitálicas, pero los resultados nunca fueron buenos, sino más bien regulares. La cinética de la difenilhidantoína sería entre rápida e intermedia; es decir, estaría entre mexiletina y quinidina.

J. LERMA: Usted ha mostrado que cuando suprime la inactivación del canal de sodio, la lidocaína deja de tener efecto, mi pregunta es ¿la lidocaína se une entonces al péptido de inactivación?

J. TAMARGO: El mecanismo de acción de lidocaína varía en función de la dosis. A concentraciones que son dos o tres veces superiores a las terapéuticas ocurre lo que le he presentado, mientras que a dosis más altas se uniría a un estado que sería el más cercano a la apertura-apertura. En otro trabajo que está en fase final de redacción lo que se ha hecho es modificar el triplete IFM de la inactivación rápida, y cuando esto se cambia por tres Q, lo que se observa es que el fármaco también pierde parte de su efectividad.

W. BUÑO: Me gustaría saber por qué utiliza despolarizaciones tan pequeñas, de –40 o –30 mV. En estas condiciones cuando la activación y la inactivación son pequeñas, hay que tener cuidado especialmente con la corriente de sodio, ya que se puede entrar en la *window* y tener una inactivación parcial.

J. TAMARGO: La razón es que estos experimentos se realizaron para ver inactivación rápida-lenta empleando un rango en el cual pueden aparecer reaperturas.

Posibilidades de manipulación farmacológica de los canales de potasio

C. González-García, R. Granja, J.M. Fernández, V. Izaguirre y V. Ceña

Departamento de Farmacología y Terapéutica e Instituto de Neurociencias.
Universidad de Alicante.

Introducción

Durante estos últimos años hemos asistido a una explosión de conocimiento sobre la relación estructura y función de los canales de K^+. Este avance ha resultado de la utilización conjunta de técnicas de ADN recombinante con técnicas electrofisológicas y farmacológicas[1]. Como resultado de este incremento en su número, se ha producido una gran confusión en cuanto a la nomenclatura con la que nos referimos a los diversos tipos de canales de K^+. Esta pequeña revisión va a estar dividida en 3 apartados: en primer lugar, una clasificación somera y, por tanto, no exhaustiva de los tipos de canales K^+ conocidos y de su función. En segundo lugar, se expondrán las acciones de alguno de los fármacos que se utilizan para bloquear las corrientes de K^+ y se indagará en cuáles son los determinantes moleculares de este bloqueo y, finalmente, hablaremos sobre un grupo de fármacos que tienen un gran potencial terapéutico como son los fármacos capaces de abrir canales de K^+.

Clasificación de los canales de K^+

Una posible clasificación de canales de K^+ viene expresada en la tabla I. A partir de dicha clasificación podemos ampliar brevemente la información sobre cada uno de los tipos de canales de K^+ presentes en la misma.

Rectificador retrasado (Delayed retifier)

Es el canal que contribuye mayoritariamente a la corriente de K^+ dependiente de voltaje en la gran mayoría de las células[2,3]. Cuando se registran las corrientes globales en una preparación, sus características cinéticas incluyen una activación sigmoidal y un cierre exponencial cuando se termina el pulso despolarizante[3], siendo su inactivación muy lenta durante la duración del pulso. Este canal puede ser bloqueado mediante diversas manipulaciones farmacológicas como la aplicación de tetraetil amonio (TEA) desde el lado interno de la membrana plasmática. Desde este lado citoplásmico, el canal es también bloqueado por los iones Ca^{2+} y Ba^{2+}. No obstante, cuando los fármacos bloqueadores se aplican desde el exterior de la membrana plasmática, la situación es algo diferente, ya que la aplicación de TEA o 4-amino piridina (4-AP) sólo es capaz de producir bloqueo en ciertas preparaciones, mientras que en otras no lo produce. Esta diversidad sugería la

TABLA I
CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE POTASIO

Tipo de canal	*Bloqueadores específicos*
Rectificador retrasado	Citoplásmico: Ca^{2+}, Ba^{2+}, TEA Extracelular: TEA, 4-AP
Corriente transitoria (A)	Citoplásmico: TEA, Cs^- Extracelular: 4-AP
Rectificador anómalo	Citoplásmico: TEA Extracelular: Cs^+, Ba^{2+}
Activado por Ca^{2+}	
Pequeña conductancia	Apamina
Gran conductancia	TEA, caribdotoxina
Regulados por neurotransmisores y segundos mensajeros	

posibilidad de que nos encontráramos frente a una familia de canales dependientes de voltaje en vez de frente a un único canal[4], aspecto este sobre el que trataremos posteriormente. Un aspecto importante de las propiedades de un canal iónico consiste en conocer la función fisiológica que cumple en la célula. En el caso de los rectificadores retrasados se han propuesto dos funciones fundamentales para estos canales: repolarización durante la producción de un potencial de acción y contribución a la duración del período refractario en tejidos excitables.

Corrientes inactivantes (corrientes tipo A)

Una de las características de este tipo de corrientes consiste en que son de comienzo muy rápido y transitorias[5]. La inactivación del estado estacionario de esta corriente es completa cuando se mide al potencial de membrana de reposo. Generalmente este tipo de corriente no es la única corriente de K^+ presente en las células, sino que está acompañada por otros tipos de corrientes de K^+ como el rectificador retrasado. La corriente iónica generada por la activación de este grupo de canales de K^+ es bloqueada por la aplicación, en el lado extracelular de la membrana plasmática de 4-AP o mediante la aplicación en el lado citoplásmico de Cs^+ o TEA. Las funciones fisiológicas que se adscriben a este canal tienen que ver, sobre todo, con la repolarización del potencial de acción y la regulación de la velocidad de disparo de potenciales de acción.

En general, se considera, en sentido estricto, a estos 2 grupos de canales de K^+ dentro del grupo de los canales dependientes de voltaje. Cuando se intentaron aislar estos dos tipos de canales de K^+, mediante técnicas de biología molecular, se observó que existía una familia de genes que codificaban diferentes canales de K^+ dependientes de voltaje[4]. Existen 6 grupos diferentes de genes, que codifican los diversos tipos de canales de K^+ dependientes de voltaje, denominados Kv1 a Kv6, aunque dentro de cada uno de estos grupos puede existir más de un gen. Aunque el grado de homología entre los diversos genes es grande, las pequeñas diferencias podrían condicionar la diferente sensibilidad a los fármacos bloqueadores.

Rectificadores anómalos (Inward rectifier)

En estos canales de K^+, la conductancia se incrementa mediante la hiperpolarización, permitiendo la entrada de K^+ en la célula[6,7]. La característica biofísica más importante de este canal es la rectificación de la corriente que aparece a potenciales próximos al potencial de equilibrio para el K^+. Esta corriente de K^+ es bloqueada por TEA (aplicado en el interior de la célula), Cs^+ y Ba^{2+}. Las funciones fisiológicas atribuidas a este tipo de canales de K^+ son, entre otras, las siguientes: generación de actividad marcapasos en el corazón, fertilización del huevo y regulación de la frecuencia de descarga de potenciales de acción.

Canales de K^+ activados por Ca^{2+}

Son canales de K^+ activados por concentraciones submicromolares de Ca^{2+}. En experimentos en los que se miden corrientes globales, la cinética y la dependencia de estas corrientes están relacionadas con la activación de corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje[8]. Existen dos tipos de corrientes de K^+ activadas por Ca^{2+}, una de pequeña conductancia (15 pS) que es sensible a apamina y que, entre otras funciones celulares, es responsable de la producción de posthiperpolarizaciones[9] y, por otro lado, una corriente de gran conductancia (150-250 pS) que se bloquea por bajas concentraciones de TEA y caribdotoxina y que contribuye a poner fin a la entrada de Ca^{2+} durante un potencial de acción y a la repolarización del potencial de acción[10,11]. Ambos tipos de corriente se encuentran ampliamente distribuidos en células excitables y secretoras.

Canales regulados por segundos mensajeros

Existe un grupo, cada vez más numeroso, de canales de K^+ regulados por segundos mensajeros. Entre este grupo se encuentran, entre otros, canales que son inactivados por mecanismos de fosforilación acoplados a la activación de un receptor de serotonina como la corriente S presente en neuronas de Aplysia[12] y canales de K^+ que son activados directamente por proteínas G[13]. En este grupo de canales está incluido otro tipo de canal de K^+ que es el regulado por ATP, que desempeña un papel fundamental en la secreción de insulina en células β pancreáticas[14].

Bases moleculares de la acción de los bloqueadores de canales de K^+ dependientes de voltaje

Hemos visto en el apartado anterior que los canales de K^+ dependientes de voltaje son

sensibles al bloqueo por determinados compuestos. Actuando desde el exterior de la célula existen dos tipos de compuestos que pueden interaccionar con el canal de K^+: compuestos orgánicos, con carga positiva, entre los que los más comunes son TEA, 4-AP y quinidina y, por otra parte, toxinas como la caribdotoxina. Tomando como ejemplo el bloqueo que la administración de TEA desde el exterior de la célula ejerce sobre las corrientes de K^+ vamos a intentar comprender cuáles son los determinantes moleculares que condicionan dicha unión del bloqueador al canal.

Los estudios sobre la estructura, derivada de la secuencia, de los canales de K^+ dependientes de voltaje se han realizado, mediante mutagénesis dirigida, en canales de K^+ *Shaker*[15]. Dichos estudios han indicado la existencia de una región, denominada H5, que está formada por 19 aminoácidos y que parece formar el poro del canal[16]. En esta región del canal, los aminoácidos se numeran siempre del 1 al 19 para resaltar que esta región se conserva y aparece, aunque no siempre en la misma posición en la secuencia, en todos los tipos de canales de K^+ dependientes de voltaje clonados hasta hoy. Se ha observado que, en la familia de canales de K^+ dependientes de voltaje RCK, que están relacionados con *Shaker*, existe una diferente sensibilidad al bloqueo por TEA, siendo más sensibles RCK1 y RCK2 que RCK4 y RCK5. La sustitución de la treonina que ocupa la posición 19 de la región H5 en RCK2 por una lisina hace que ese canal pierda totalmente su sensibilidad a TEA[17]. En cambio, el cambio de la lisina, en posición 19 por cualquier aminoácido no cargado, vuelve al canal RCK4 muy sensible a TEA. Estos experimentos, junto con otros que sugieren que la incorporación de un aminoácido cargado en posición 1 disminuye la sensibilidad a TEA hacen suponer que los aminoácidos 1 y 19 forman parte del sitio de unión de TEA a los canales de K^+ dependientes de voltaje.

Fármacos que activan canales de K^+

Los fármacos que son capaces de abrir los canales de K^+ constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a su estructura química como puede verse en la tabla II. No obstante esta diversidad de estructura, todos estos fármacos actúan, inicialmente, abriendo canales de K^+ regulados por ATP[18].

Existen tres hechos importantes sobre la acción farmacológica de estos compuestos: producen una hiperpolarización de la célula, en otras palabras, el potencial de membrana se desplaza hacia el potencial de equilibrio para el K^+, con lo que se hace más negativo. En segundo lugar, su acción farmacológica se bloquea en presencia de elevadas concentraciones de K^+ extracelular y, en tercer lugar, sus acciones son bloqueadas por sulfonilureas[19] lo que, junto al desplazamiento por sulfonilureas de la fijación de estos compuestos a membranas de músculo liso[20], apoya fuertemente la idea de que su lugar de acción es el canal de K^+ activado por ATP. No obstante, han comenzado a diseñarse algunos fármacos[21] de este grupo capaces de actuar selectivamente sobre canales de K^+ activados por Ca^{2+}.

TABLA II
ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS DIVERSOS FÁRMACOS ACTIVADORES DE LOS CANALES DE POTASIO

Grupo químico	*Fármaco*
Benzopirano	Lemakalim
Tiourea/guanidina	Pinacidilo
Piridina	Nicorandilo
Pirimidina	Minoxidilo
Benzotiadiazina	Diazóxido
Tioformamida	RP 52891
Dihidropiridinas	Niguldipino

Las indicaciones terapéuticas de los fármacos que son capaces de abrir canales de K^+ podrían incluir la hipertensión arterial, el asma bronquial, la claudicación intermitente y la isquemia miocárdica.

Las bases terapéuticas de su acción en el asma vendrían determinadas, en primer lugar, por su acción hiperpolarizante sobre la fibra muscular lisa, lo que impediría que se abrieran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y, de esta forma, entrara Ca^{2+} al interior de la célula y se produjera la contracción de la célula muscular lisa[22]. Pero cada vez existen más evidencias que sugieren que estos compuestos podrían interferir con la producción de IP3 en respuesta a diversos agonistas[23].

Una de sus indicaciones terapéuticas más prometedoras podría ser en la enfermedad isquémica miocárdica. Estos compuestos, a dosis bajas, son capaces de disminuir el tamaño del infarto en perros con oclusión de la coronaria anterior[24]. No obstante, las acciones eléctricas de los fármacos que abren canales de K^+ consisten fundamentalmente en, por una parte, acortar la duración del potencial de acción cardíaco y, por otra, aumentar la concentración

de K^+ extracelular que despolarizaría la zona isquémica y así produciría un descenso en la contractilidad miocárdica[25]. Este descenso en la contractilidad disminuiría el consumo de oxígeno y disminuiría el daño isquémico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rudy B. Diversity and ubiquity of K^+ channels. Neuroscience 1980; 25: 729-749.
2. Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. J Physiol 1952; 116: 473-479.
3. Bezanilla F. Gating of sodium and potassium channels. J Membr Biol 1985; 88: 97-111.
4. Pongs O. Structural basis of voltage-gated K^+ channel pharmacology. Trends Pharmacol Sci 1992; 13: 359-365.
5. Connor JA, Stevens CF. Voltage clamp studies of a transiet outward membrane current in gastropod neural somata. J Physiol 1971; 231: 21-30.
6. Hagiwara S, Miyasaki S, Rosenthal NP. Potassium current and the effect of cessium on this current during anomalous rectification of the egg membrane of a starfish. J Gen Physiol 1976; 67: 621-638.
7. Noble D. The surprising heart: A review of recent progress in cardiac electrophysiology. J Physiol 1984; 353: 156-159.
8. Meech RW. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. A Rev Biophys Bioeng 1978; 7: 1-18.
9. Blatz MA, Magleby KL. Single apamin-blocked Ca^{2+} activated K^+ channels of small conductance in cultured rat skeletal muscle. Nature 1986; 323: 718-720.
10. Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M. Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca^{2+} -activatedK^+ channels from mammalian skeletal muscle. Nature 1985; 313: 316-318.
11. Romey G, Lazdunski M. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological functions. Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 669-674.
12. Klein M, Camardo J, Kandel ER. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. Proc Natl Acad Sci. USA 1982; 79: 5.713-5.717.
13. Logothetis DE, Kim D, Northup JK, Neer EJ, Clapham DE. Specificity of action of guanine nucleotide-binding regulatory protein subunits on the cardiac muscarinic K^+ channel. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 5.814-5.818.
14. Dunne MJ, Petersen OH. Potassium selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. Biochim Biophys Acta 1991; 1.071: 67-82.
15. Durell SR, Guy HR. Atomic scale structure and functional models of voltage-gated potassium channels. Biophys J 1992; 62: 238-250.
16. Pongs O. Structure-Function studies on the pore of potassium channels. J Membr Biol 1993; 136: 1-8.
17. MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K^+ channels. Science 1990; 250: 276-279.
18. Weston AH, Edwards G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. Biochem Pharmacol 1992; 43: 47-54.
19. Quast U, Cook NS. In vitro and in vivo comparison of two K^+ channel openers diazoxide and cromokalim and their inhibition by glibenclamide. J Pharmacol Exp Ther 1989; 250: 261-271.
20. Bray KM, Quast U. A specific binding site for K^+ channel openers in rat aorta. J Biol Chem 1992; 267: 11.689-11.692.
21. Olesen SP, Munch E, Moldt P, Drejer J. Selective activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by novel benzimidazolone. Eur J Pharmacol 1994; 251: 53-59.
22. Hamilton TC, Weir SW, Weston AH. Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. Br J Pharmacol 1986; 88: 103-111.
23. Challiss RAJ, Patel N, Arch JRS. Comparative effects of BRL 38227, nitrendipine and isoprenaline on carbachol-and histamine-stimulated phosphoinisitide metabolism in airway smooth muscle. Br J Pharmacol 1992; 105: 997-1.003.
24. Auchampach JA, Murayama M, Cavero I, Gross GJ. The new K^+ channel opener aprikalim (RP 52891) reduces experimental infarct size in dogs in the absence of hemodynamic changes. J Pharmacol Exp Ther 1991; 259: 961-967.
25. Mitani A, Kinoshita K, Fukamachi K, Sakamoto M, Kurisu K, Tsuruhara Y et al. Effects of glibenclamida and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. Am J Physiol 1991; 261: H1.864-H1.871.

DISCUSIÓN

E. DEL POZO: En relación con las posibles aplicaciones terapéuticas de los agentes que abren canales de potasio, hemos observado que la cromakalina, un agonista del canal de potasio, potencia de forma dosisdependiente el efecto analgésico de diferentes agonistas

mu, en concreto de morfina, buprenorfina y metadona, así como la clonidina; este efecto es inhibido también de forma dosisdependiente por sulfonilureas. Por otro lado, también comprobamos que inhibía la actividad epileptogénica del pentilentetrazol, y en este sentido estos agentes podrían tener utilidad. Quisiera también referirme a la posible influencia del tejido sobre el efecto de los agonistas del canal de potasio en el sentido de que parece que en músculo liso, cromakalina y pinacidilo actúan también en canales de potasio calciodependientes, mientras que en otro tipo de preparaciones como en músculo esquelético, músculo cardíaco o células pancreáticas el efecto es más específico sobre canales de potasio ATP dependientes. ¿Podría aclarar estas diferencias?

V. CEÑA: Uno de los aspectos a los que no me he referido en la charla es la supuesta selectividad de estos fármacos, y esta selectividad no se refiere tan sólo a su efecto sobre canales de potasio. Por ejemplo, estos fármacos pueden inhibir la entrada de calcio en músculo liso por un mecanismo hiperpolarizante, ya que al hiperpolarizar la polaridad de apertura del canal de calcio voltajedependiente disminuye y, por tanto, se van a abrir menos canales de calcio. Pero aparte de eso hay otro efecto interesante que consiste en que estos compuestos son también capaces de inhibir las contracciones inducidas por agonistas, y cuando se inhiben contracciones inducidas por agonistas que están mediadas probablemente por liberación de calcio del retículo endoplásmico a través de la generación de IP3 hay que pensar que junto a esta acción en la membrana existen otras acciones intracelulares. Se ha descrito que en células de músculo liso alguno de estos compuestos son capaces de inhibir la síntesis de IP3 en respuesta a un agonista, lo cual es otro mecanismo de acción que puede contribuir a esa acción vasodilatadora y que no tiene nada que ver con su acción sobre canales iónicos en la membrana.

F. SALA: ¿Cuál es el mecanismo íntimo por el que actúan estos abridores sobre los distintos canales de potasio?

V. CEÑA: Parece ser que su mecanismo de acción consiste a nivel de competición con el sitio de fijación de ATP al canal. No una competición directa, sino que de alguna forma modulan la sensibilidad del canal al ATP.

J. LÓPEZ BARNEO: Entonces sugiero que se les llame agonistas del canal sensible de ATP, ya que el término «abridores de canales de potasio» es confuso puesto que induce a pensar en los canales de potasio clásicos voltajedependientes. Me interesaría saber cómo está el estado actual de la farmacología de los agonistas o abridores de canales de potasio, pero no centrada en los canales regulados por ATP sino más en general. Usted se ha referido antes a los canales de potasio regulados por calcio.

V. CEÑA: Desconozco si existen fármacos que específicamente sean capaces de abrir canales de potasio voltajedependientes. De hecho, el nombre de estos fármacos debe atribuirse históricamente a que fueron los primeros compuestos en los cuales se demostró una acción directa de capacidad de abrir un tipo de canal de potasio, e inicialmente se consideraron muy selectivos para el canal de potasiodependiente de ATP. Actualmente con estudios de modificaciones químicas de la molécula se han obtenido algunos compuestos capaces de abrir selectivamente canales de potasio activados por calcio. La cuestión que subyace en esto es ¿hasta qué punto estas son moléculas absolutamente selectivas para abrir un tipo de canales y no tienen otras acciones? De hecho muchos de estos compuestos que originalmente se consideraron fármacos que eran capaces de abrir selectivamente el canal de potasiodependiente de ATP tienen otras acciones intracelulares.

J. TAMARGO: Los que trabajamos en vasos con este tipo de fármacos hemos tenido la oportunidad de demostrar que modifican la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico en preparaciones incubadas en 0 calcio, y que son capaces de inhibir la entrada de calcio inducida por noradrenalina en preparaciones tratadas con 10^{-5} mol de D600. Esto implica necesariamente que tiene que ser la entrada de calcio inducida por noradrenalina, no sensible a bloqueadores de canales de calcio voltajedependientes, es decir, la entrada de calcio a través de canales dependientes de receptor o inducida por noradrenalina. Además, tanto la disminución de IP_3 como la disminución de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático parece ser siempre un fenómeno voltajedependiente, al menos en el músculo esquelético, ya que al hiperpolarizar la membrana disminuye la posibilidad de liberación de calcio.

A.G. GARCÍA: Me ha llamado la atención el comentario de la Dra. del Pozo sobre el efecto analgésico de alguno de estos fármacos acti-

vadores de canales de potasio sensibles a ATP, y ello porque se oponen a la entrada de calcio por inactivarse los canales de calcio mediante la hiperpolarización que producen como antes comentaba el Dr. Ceña. Si como se ha demostrado, los calcioantagonistas muestran un efecto sinérgico con los opioides en cuanto a analgesia, ¿no es incongruente que los activadores de canales de potasio, que bloquean indirectamente la entrada de calcio, tengan efecto analgésico?

E. DEL POZO: Los activadores de canales de potasio bloquean la entrada de calcio indirectamente. Existen datos electrofisiológicos que indican que los agonistas kappa bloquean directamente canales de calcio y en la analgesia inducida por estos agentes los agonistas y los antagonistas de los canales de potasio ATP-dependientes no tienen ningún efecto. O sea, que se puede discriminar la interacción de los agonistas-antagonistas del canal de potasio con los diferentes opiáceos, según que éstos ejerzan su acción directamente a través de un canal de potasio o bien la ejerzan directamente a través de un canal de calcio.

A.G. GARCIA: Teniendo en cuenta lo dicho hasta ahora ¿no sería interesante disponer de una molécula híbrida? Es decir, una molécula en la que se pudieran conjugar algunas propiedades que contrarrestaran los efectos no deseables de estos fármacos, concretamente un bloqueador beta que a su vez produjera una activación de canales de potasio podría resolver muchos problemas. ¿Les parece factible el diseño de un fármaco híbrido de estas características?

C. SUNKEL: Sí, esta es la tendencia en la actualidad. Se intenta diseñar fármacos con una actividad dual para conseguir dos efectos, o un efecto que antagonice algún otro efecto no deseado.

V. CEÑA: En este contexto, existe un fármaco, nivuldipino, que claramente es un derivado de dihidropiridina y es también un antagonista del calcio.

Diversidad de canales de calcio voltajedependientes

L. Gandía, A. Albillos, M.G. López y B. Lara

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

Todas las células, y en especial las del sistema nervioso, se comunican entre sí, utilizando para ello un lenguaje de naturaleza química o eléctrica. La información recibida es procesada mediante un complejo sistema de mensajeros intracelulares que van a traducir la señal recibida en un lenguaje comprensible para su maquinaria metabólica. El catión calcio (Ca^{2+}) es uno de los mensajeros más ubicuos y con mayor participación en procesos de regulación celular. Existen diferentes mecanismos reguladores (bomba de Ca^{2+}, secuestro en organelas intracelulares, proteínas fijadoras de calcio) que permiten mantener el Ca^{2+} citosólico en valores extremadamente bajos (alrededor de 100 nM), mientras que la concentración que este catión alcanza en el medio extracelular es de unas 25.000 veces superior. A esto hay que añadir el hecho de que el ambiente eléctrico negativo existente a nivel intracelular va a generar un gradiente eléctrico que también favorecerá la entrada de este catión en la célula.

Ante esta situación, es factible que muchos estímulos sean responsables de generar una señal consistente en la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, que regula y controla otros tantos procesos celulares que van desde la fecundación del oocito por el espermatozoide hasta el desarrollo del embrión, desde la contracción del corazón hasta la de los músculos liso y estriado, desde la coagulación de la sangre hasta la regulación de la excitabilidad neuronal, desde el transporte axoplásmico hasta el envejecimiento y muerte neuronal, desde la secreción de hormonas hasta la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico.

Estas elevaciones de los valores citosólicos de Ca^{2+} pueden producirse tanto por la liberación del catión desde diferentes organelas intracelulares como por su entrada desde el exterior celular a través de diferentes canales iónicos. Entre estos últimos podemos distinguir aquellos acoplados a receptores y aquellos que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana (canales de calcio voltajedependientes), y que serán objeto de discusión del presente trabajo.

Canales de calcio voltajedependientes

El estudio y caracterización de las diferentes vías de entrada de Ca^{2+} hacia el interior celular va a resultar importante por varias razones: por un lado, para conocer la importancia del Ca^{2+} como mensajero intracelular capaz de disparar funciones tan diferentes, no sólo en diferentes células sino también en una misma célula; por otro lado, el conocimiento de estas diferentes vías puede favorecer el desarrollo de nuevos fármacos que interfieran selectivamente con estas vías y que puedan tener un potencial terapéutico (p. ej., en enfermedades cardiovasculares y del sistema nervioso, muerte neuronal).

Para la identificación y caracterización de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) se han empleado diferentes aproximaciones metodológicas, entre las que podemos destacar los estudios de fijación de radioligandos[1], estudios de captación de cationes divalentes marcados radiactivamente[2], estudios con sondas fluorescentes sensibles a Ca^{2+}, particularmente fura-2[3], estudios funcionales[4] o estudios de biología molecular[5]. Entre todas estas metodologías, lo que ha supuesto los mayores avances en la identificación y caracterización de los CCDV ha sido el desarrollo de las técnicas de fijación de voltaje en parches de membrana[6] *(patch-clamp)*, junto al aislamiento y purificación de potentes toxinas[7] con selectividad para los diferentes subtipos de canales de Ca^{2+}.

Los canales iónicos dependientes de voltaje constituyen una familia de estructuras proteicas constituyentes de las membranas celulares, formadas por varias subunidades transmembrana.

TABLA I. CLASIFICACIÓN DE CANALES DE CALCIO VOLTAJEDEPENDIENTES

Tipo de canal	*Voltaje de Activación*	*Conductancia*	*Cinética de inactivación*	*Farmacología*
Canales de bajo umbral de activación (LVA)				
T	>-60 mV	6-9 pS	τ=5-10 ms Voltajedependiente	Ni^{2+} Amilorida
Canales de alto umbral de activación (HVA)				
L	>-50 mV	18-28 pS	τ>200 ms Calciodependiente	Co^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+} Dihidropiridinas
N	>-50 mV	7-14 pS	τ=50 ms Calciodependiente	Co^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+} ω-conotoxina GVIA ω-conotoxina MVIIA ω-conotoxina MVIIC ω-conotoxina MVIID
P	>-45 mV	9,14,19 ps	τ=1 s	Co^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+} FTX, sFTX ω-agatoxina IVA ω-conotoxina MVIIC
Q				ω-conotoxina MVIIC ω-conotoxina MVIID

Entre estas cabe destacar la subunidad α_1 que forma el poro iónico y que va a ser la responsable de la permeabilidad al Ca^{2+} y de los mecanismos que regulan la apertura del canal. En esta subunidad se encuentran los sitios de unión para los diferentes antagonistas. La presencia de las otras subunidades (α_2, β, γ y δ) es también crítica pues estas contribuyen a la funcionalidad del canal. Hasta el momento se han identificado hasta 6 subunidades α_1 (A, B, C, D, E, S) y varias α_2 y β, con lo que la posibilidad de combinaciones justifica la diversidad de canales de Ca^{2+} descritos en varios tejidos.

Dejando un poco al margen toda esta nueva información que emerge de estudios de biología molecular, nos centraremos en los avances obtenidos en los últimos años gracias a los estudios electrofisiológicos desarrollados tanto en la célula entera como en el canal único. Se han identificado y clasificado al menos cuatro subtipos (T, L, N y P) de canales de Ca^{2+} voltajedependientes en función de sus propiedades biofísicas y farmacológicas.

Las primeras clasificaciones realizadas[8-11] distinguieron dos grandes subgrupos en función del rango de voltaje en el que se produce su activación (tabla I). Así, se denominan canales de bajo umbral de activación (LVA) aquellos que se activan por voltajes por encima de –50 mV. Son canales que se pueden abrir en respuesta a pequeñas despolarizaciones desde potenciales de membrana bastante negativos. Por otro lado, se consideran canales de alto umbral de activación (HVA) aquellos cuya activación se produce por voltajes superiores (–30 a –20 mV). Otras características biofísicas y farmacológicas nos van a permitir definir los diferentes subtipos de canales dentro de estos dos grandes subgrupos.

Canales de bajo umbral de activación (LVA)

Dentro de este subgrupo tan sólo se ha identificado un subtipo de canal, denominado T (de *transient*). Este canal, descrito por primera vez por Carbone y Lux[8], recibe su nombre por sus características cinéticas, al tratarse de un canal con una rápida inactivación. Se caracteriza también, como ya hemos comentado, por un bajo umbral de activación (–50 a –30 mV), una conductancia unitaria de 8 pS (en presencia de 110 mM Ba^{2+}), una permeabilidad similar a Ba^{2+} y Ca^{2+} y su inactivación cuando se mantiene el potencial de membrana de la célula en –50 mV.

Farmacológicamente, los canales tipo T se caracterizan principalmente por su insensibilidad a fármacos de tipo 1,4-dihidropiridinas (DHP) como nifedipino y Bay K 8644, y una menor

sensibilidad al bloqueo por el catión inorgánico Cd^{2+} que al Ni^{2+}. Se han descrito algunos compuestos orgánicos que pueden bloquear específicamente este subtipo de canal. Entre estos cabe destacar el l-octanol y la amilorida.

Los canales T han sido identificados en una gran variedad de células, incluyendo tanto neuronas centrales como periféricas, células musculares cardíacas, esqueléticas y musculares lisas, fibroblastos, osteoblastos, oocitos y algunas células secretoras. En tejidos excitables, la presencia de este subtipo de canal se relaciona con una actividad rítmica de tipo marcapasos[12].

Canales de alto umbral de activación (HVA)

Si bien inicialmente las características electrofisiológicas (conductancia unitaria del canal, cinéticas de activación e inactivación) constituyeron los principales argumentos para la clasificación de los diferentes subtipos de canales de calcio, en los últimos años la ayuda de herramientas farmacológicas ha ganado importancia en la identificación y caracterización de los diversos subtipos de canales de Ca^{2+} HVA. Hasta el momento, existen tres subtipos claramente identificados (denominados L, N y P)[13-15] y recientemente se han comenzado a identificar y caracterizar otros dos subtipos (denominados Q y R)[16,17].

En general, los canales de Ca^{2+} HVA se caracterizan por su activación por mayores despolarizaciones (–30 a –20 mV), su mayor permeabilidad al Ba^{2+} que al Ca^{2+} y su mayor sensibilidad al bloqueo por Cd^{2+} que por Ni^{2+}. Las variaciones en sus cinéticas de activación e inactivación, así como su diferente farmacología, constituyen las bases para la identificación y caracterización de los diferentes subtipos existentes.

Los canales de Ca^{2+} del subtipo L se caracterizan por mostrar una lenta inactivación (τ_{inac} > 500 ms), siendo además menos sensibles al mantenimiento de un potencial de membrana ligeramente despolarizado. Su conductancia unitaria está en el rango de 18-25 pS. Farmacológicamente se caracteriza por su alta sensibilidad a DHP, tanto agonistas (Bay K 8644) como antagonistas (nifedipino, nitrendipino, furnidipino), por lo que también son conocidos como canales sensibles a DHP. Particularmente característico es el efecto de las DHP agonistas, caracterizado por una prolongación del tiempo medio de apertura de estos canales, fácilmente identificable en estudios de canal único y que se traduce en una prolongación de las corrientes de cola (en estudios en célula entera) por enlentecer la desactivación de los canales.

Los canales de Ca^{2+} tipo L se encuentran prácticamente en casi todas las células excitables y en muchos tipos de células no excitables. Constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} en el músculo cardíaco y músculo liso, y contribuyen al control de la liberación de hormonas y neurotransmisores en diferentes preparaciones endocrinas y neuronales.

Los canales del subtipo N pueden distinguirse de los L por su cinética de inactivación, ya que estos presentan una inactivación lenta (τ_{inac} 50-80 ms), aunque más rápida que la descrita para los canales tipo L. Otras características biofísicas que los diferencian de los canales de Ca^{2+} tipo L son mayor sensibilidad a potenciales de membrana ligeramente despolarizados y su conductancia unitaria, que es algo menor (13 pS). A pesar de estos criterios biofísicos diferenciales, en algunas preparaciones puede observarse la existencia de un componente N no inactivante[4], por lo que en general se considera que la separación de los subtipos de canales basada simplemente en criterios cinéticos puede conducir a conclusiones erróneas. Esto ha favorecido la búsqueda y desarrollo de herramientas farmacológicas que permitan una mejor caracterización. Farmacológicamente los canales de Ca^{2+} tipo N se caracterizan por su insensibilidad a DHP y por bloquearse eficazmente, de forma irreversible, por la toxina ω-conotoxina GVIA (CTx-GVIA)[7,9,18]. Aunque algunos autores han encontrado un cierto bloqueo de canales tipo L por esta toxina, existe un amplio consenso en considerar a esta toxina como selectiva para los canales del subtipo N. Los canales tipo N predominan en neuronas simpáticas y sensoriales, encontrándose también en proporciones variables en diferentes tejidos endocrinos. No parecen estar presentes en células musculares. Funcionalmente parecen estar implicados en el control de la transmisión sináptica en neuronas periféricas y en la regulación de la liberación hormonal en células neuroendocrinas.

La reciente identificación y caracterización de nuevos subtipos de canales de Ca^{2+} ha sido posible gracias al aislamiento, purificación y síntesis de nuevas y potentes toxinas capaces de bloquear selectivamente componentes de las corrientes globales de Ca^{2+} que se habían mostrado resistentes al bloqueo por DHP y CTx-GVIA. En este sentido, en 1989, Llinás et al[19] encontraron que la toxina contenida en el veneno de la araña *Agelenopsis aperta* (FTX) era

capaz de bloquear las corrientes de Ca^{2+} resistentes a DHP y CTx-GVIA en neuronas de Purkinje, lo que les indujo a describir la existencia de un nuevo subtipo de canal de Ca^{2+} HVA que denominaron P (por «Purkinje»). La posterior purificación de este veneno llevó a la identificación de varias subfracciones. Una de estas fracciones, las poliaminas (entre las que se encuentra la FTX y su derivado sintético sFTX) se mostraron como potentes bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tipo P, pero también parecían bloquear otras corrientes iónicas[20]. Otra de las fracciones purificadas, las ω-agatoxinas[21], parecen bloquear potentemente varios subtipos de canales de Ca^{2+}, siendo la ω-agatoxina IVA (Aga-IVA)[15,22] un bloqueador selectivo para los canales de tipo P. Actualmente se utiliza la Aga-IVA como herramienta farmacológica para caracterizar la presencia de esta subpoblación de canales en un tipo celular. El bloqueo de canales tipo P por Aga-IVA se puede observar con concentraciones bajas (10-100 nM) y se caracteriza por ser prácticamente irreversible tras el lavado de la toxina, aunque puede ser revertido con la aplicación de trenes de pulsos despolarizantes[15,22]. Los canales tipo P se encuentran ampliamente expresados en neuronas de Purkinje y también parecen coexistir en otras preparaciones como en neuronas de hipocampo y en células cromafines bovinas[15,22-25].

Se ha aislado recientemente otro nuevo grupo de toxinas, purificadas y sintetizadas a partir del caracol marino *Conus magus*[26,27]. Se han denominado ω-conotoxinas MVII y parecen bloquear selectivamente diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} en neuronas. Entre estas, la ω-conotoxina MVIIA parece bloquear los canales de Ca^{2+} tipo N, pero a diferencia de la CTx-GVIA, lo hace de forma reversible. Mediante técnicas de biología molecular se ha conseguido sintetizar la toxina ω-conotoxina MVIIC (CTx-MVIIC)[7,26], que parece bloquear tanto canales tipo N como canales tipo P en diferentes preparaciones neuronales, pero que ha servido para identificar la presencia de un nuevo subtipo de canal HVA que ha recibido diferentes denominaciones. A partir de estudios de fijación de toxinas marcadas radiactivamente se ha sugerido la existencia de un canal «O» correspondiente a la existencia de un sitio de fijación de alta afinidad específico para la CTx-MVIIC[28]. Funcionalmente, se ha caracterizado la existencia de un subtipo de canal de Ca^{2+} insensible al bloqueo por DHP, CTx-GVIA y Aga-IVA, que puede ser bloqueado por esta nueva toxina CTx-MVIIC, y que ha sido denominado «canal Q»[15,17,29]. Este nuevo subtipo de canal se ha identificado en neuronas de hipocampo, donde parece mediar en la transmisión sináptica junto a los canales tipo N[17].

Finalmente, en algunas preparaciones neuronales se ha observado la existencia de un componente residual de las corrientes globales de Ca^{2+} tras el tratamiento con todos estos bloqueadores por lo que se especula con la existencia de un quinto subtipo de canal de Ca^{2+}. Este nuevo subtipo de canal HVA de rápida inactivación y caracterizado farmacológicamente por su insensibilidad al bloqueo por DHP, CTx-GVIA, Aga-IVA y CTx-MVIIC y por su sensibilidad al bloqueo por Ni^{2+}, ha sido denominado R[15] aunque en la actualidad, su identificación y caracterización es controvertida.

Finalmente, cabría destacar el hecho de que esta clasificación funcional de canales de Ca^{2+} no se corresponde con exactitud a las nuevas clasificaciones que emergen a partir de estudios de biología molecular. Como ya hemos comentado anteriormente, la identificación de diferentes subunidades α_1, α_2 y β y las diferentes posibilidades de combinación de estas subunidades pueden originar subtipos de canales de Ca^{2+} en experimentos de reconstitución que no se corresponden con esta clasificación funcional.

Subtipos de canales de calcio en la célula cromafín

Los datos obtenidos durante los últimos años por varios grupos investigadores utilizando diferentes técnicas, que incluyen estudios de secreción de catecolaminas, trasiegos de isótopos radiactivos, monitorización de las concentraciones citoplasmáticas de Ca^{2+} libre y registros directos de corrientes iónicas sugieren la existencia de varios subtipos de canales de Ca^{2+} voltajedependientes en la membrana de las células cromafines que, además, están acoplados de manera diferente al proceso secretor de catecolaminas.

Mediante la combinación de técnicas electrofisiológicas con herramientas farmacológicas (fármacos y toxinas), hemos estudiado la presencia de diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} voltajedependientes en células cromafines de tres especies diferentes: rata, gato y ternera. La selección de estas tres especies se hizo según la distinta sensibilidad del proceso secretor de catecolaminas frente a diferentes bloqueadores de canales de Ca^{2+}.

En las células cromafines bovinas, la existencia de más de un subtipo de canales de Ca^{2+} ya fue sugerida en la década de los ochenta, gracias a experimentos en los que se mostraba que el derivado de 1,4-dihidropiridinas (DHP) nitrendipino bloqueaba la secreción de [^{3}H]-noradrenalina en células cromafines bovinas estimuladas con nicotina o con [K^+] elevadas[30]. Además, el Bay K 8644, otro derivado DHP potencia la captación de $^{45}Ca^{2+}$ en células cromafines, así como la secreción de catecolaminas[31,32]. Posteriormente, mediante experimentos de fijación de radioligandos se demostró que la membrana plasmática de la célula cromafín contiene, además de sitios de unión para [^{3}H]-nitrendipino[31,33] y [^{3}H]-isradipino[34], otros sitios que reconocen la [^{125}I]-ω-conotoxina GVIA[33]. Además, tanto nitrendipino como CTx-GVIA bloquean parcialmente la captación de $^{45}Ca^{2+}$ en células cromafines bovinas despolarizadas con K^+[33].

Estas dos observaciones sugirieron que la célula cromafín bovina pudiera expresar más de un subtipo de canal de Ca^{2+}; al menos el L (sensible a DHP) y el N (sensible a CTx-GVIA). Esta heterogeneidad de canales de Ca^{2+} se corroboró en 1991 con la aparición de 4 publicaciones. Los artículos en cuestión comunicaban el hallazgo de dos[34-37] o tres[38] subtipos de canales de Ca^{2+} en células cromafines bovinas, mediante registros con técnicas de *patch-clamp* de las corrientes globales o corrientes microscópicas que fluyen a través de dichos canales. Un subtipo de esos canales era sensible a DHP, pero otros no. Posteriormente, el uso de toxinas permitió disecar un componente sensible a CTx-GVIA[23,24,39,40], corroborando nuestros experimentos funcionales y de unión de radioligandos[33] y apuntalando nuestra hipótesis inicial de la existencia de canales L y N en la célula cromafín bovina. Pero un hecho a destacar es que en todos estos estudios se describía la presencia de un importante componente o bloqueado por la combinación de DHP y CTx-GVIA. La reciente disponibilidad de toxinas que bloquean específicamente los canales de Ca^{2+} del subtipo P nos permitió investigar si este nuevo subtipo de canal de Ca^{2+} estaría presente en la membrana de las células cromafines bovinas. Los resultados obtenidos utilizando sFTX[23] y Aga-IVA[24] sugieren la presencia de un importante componente con un comportamiento farmacológico que remeda al canal P descrito primero por Llinás et al[19] en las neuronas cerebelosas de Purkinje. En los últimos meses, la utilización de otra toxina, la ω-conotoxina MVIIC (CTx-MVIIC) nos ha permitido aislar lo que podría ser un cuarto subtipo de canal de Ca^{2+} en esa célula, que bien pudiera corresponder al que se ha dado en llamar O[28] o Q[16,17].

En células cromafines de gato se realizaron experimentos similares. El interés de esta especie es grande ya que desde 1984 sabíamos que el proceso secretor de catecolaminas parecía controlarse exclusivamente por un canal de Ca^{2+} tipo L, ya que la secreción se bloquea completamente por DHP[30,41,42]. Los registros de las corrientes globales de Ba^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} mostraron una alta sensibilidad al bloqueo por DHP (tanto nisoldipino como furnidipino bloquearon un 45%), pero es de destacar la presencia de un importante componente (45%) sensible a CTx-GVIA[43]. Incluso en presencia de DHP, CTx-GVIA no es posible obtener un bloqueo completo de las corrientes globales de Ba^{2+}, lo que podría sugerir la coexistencia de una pequeña población de canales del subtipo P, lo que parece confirmado por el hecho de que la Aga-IVA, a concentraciones de 50-200 nM, es capaz de inducir un pequeño, aunque significativo, bloqueo de estas corrientes.

Finalmente, este tipo de estudios ha sido también repetido en células cromafines aisladas a partir de médula adrenal de rata. El proceso secretor de catecolaminas en esta especie es modulado de forma clara por fármacos DHP si bien se ha observado un pequeño componente resistente a estos fármacos[44]. Al estudiar las corrientes globales de Ba^{2+} a través de canales de Ca^{2+} se ha observado que, al igual que en bovinos y en gato, sólo se observa la existencia de canales de alto umbral (HVA) en estas células. En cuanto a su sensibilidad farmacológica, se pudo observar la existencia de un componente mayoritario modulado por DHP tanto agonistas como antagonistas, pero también se constató la presencia de componentes sensibles a CTx-GVIA (31%) y Aga-IVA (15%)[45].

A modo de resumen, ha podido comprobarse la presencia de al menos tres subtipos de canales de Ca^{2+} mediante la combinación de técnicas electrofisiológicas y las herramientas farmacológicas disponibles actualmente. Estos tres subtipos (L, N y P) parecen encontrarse en proporciones diferentes en las tres especies estudiadas (fig. 1). Así, por ejemplo, en bovinos el componente L es minoritario mientras que este es el principal componente en el gato y principalmente en la rata. Por el contrario, el componente P parece ser mayoritario en la célula cromafín bovina, mientras que su presencia es mucho menos patente en las otras dos especies.

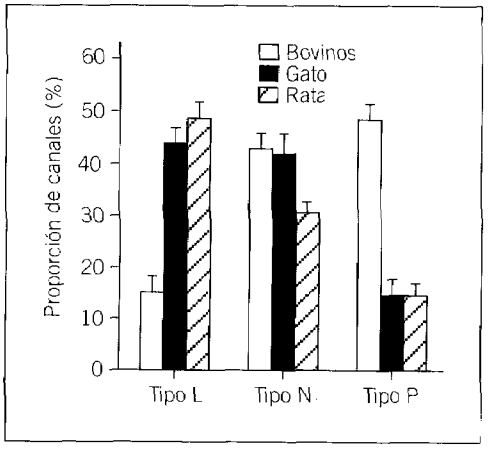

Fig. 1. Contribución relativa de los canales de los subtipos L, N y P en las corrientes globales a través de canales de Ca^{2+} en células cromafines de rata, gato, y bovinos. Para más detalles véanse referencias 23, 24, 42 y 44.

Es plausible pensar que estas drásticas diferencias podrían tener implicaciones fisiológicas en cuanto a la contribución de cada subtipo de canal tanto en la regulación del proceso secretor de catecolaminas como en otros procesos Ca^{2+} —dependientes en estas tres especies animales.

Consecuencias funcionales de la diversidad de canales de Ca^{2+}

Con la creciente disponibilidad de toxinas específicas no sólo ha sido posible identificar y caracterizar la existencia de múltiples subtipos de canales de Ca^{2+} en diferentes preparaciones neuronales, sino que también ha sido factible la identificación de los subtipos de canales implicados en procesos de neurotransmisión a diferentes niveles del sistema nervioso central y periférico, tema que se trata en el artículo posterior de A. G. García et al. Por otro lado, el desarrollo de nuevas técnicas de imagen ha permitido la identificación de zonas activas en la membrana (definidas como *hot spots*) en las que parece que tiene lugar la exocitosis de neurotransmisores, junto a otras zonas silentes en las que no se produce este proceso de exocitosis. Es plausible que estas zonas activas estén colocalizadas junto a un determinado subtipo de canal de Ca^{2+} que controlaría el proceso secretor. Estos canales de Ca^{2+} permitirían el rápido acceso del Ca^{2+} desde el exterior celular, generando un incremento en las concentraciones citosólicas de calcio libre en zonas próximas a la membrana en las que acontece la exocitosis[46].

Resumen

Mediante la combinación de técnicas electrofisiológicas y herramientas farmacológicas (fármacos dihidropiridínicos y toxinas selectivas), se ha descrito la presencia de al menos cinco subtipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (denominados T, L, N, P y Q) en diferentes tipos neuronales. Ante esta creciente diversidad, cabe plantearse cuál es la función de cada uno de estos subtipos y/o qué subtipo de canal regula la liberación de un determinado neurotransmisor en las sinapsis centrales y periféricas. En diferentes sinapsis se ha postulado que son los canales N- y/o los Q- los que controlarían la transmisión sináptica. Estas preguntas surgen también en relación con células secretoras en cuya membrana se encuentran diferentes subtipos de canales de Ca^{2+}, como es el caso de las células cromafines adrenomedulares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferry DR, Golsmann H. Evidence for multiple receptor sites within the putative calcium channel. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol 1982; 321: 80-83.
2. Artalejo CR, García AG, Aunis D. Chromaffin cell calcium channel kinetics measured isotopically through fast calcium, strontium and barium fluxes. J Biol Chem 1987; 262: 915-927.
3. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RW. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1985; 260: 344-345.
4. Fleckenstein A. History of calcium antagonists. Circ Res 1983; 52 (Supl 1): 3-16.
5. Snutch TP, Leonard JP, Gilbert MM, Lester HA, Davidson N. Rat brain express a heterogeneous family of calcium channels. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 3.391-3.395.
6. Hamil OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Eur J Physiol 1981; 391: 85-100.
7. Olivera BM, Miljanich G, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω-conotoxins and ω-agatoxins. Ann Rev Biochem 1994; 63: 823-867.

8. Carbone E, Lux HD. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. Nature 1984; 310: 501-502.
9. Nowycky MC, Fox AP, Tsien RW. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. Nature 1985; 316: 440-443.
10. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. J Physiol 1987; 394: 149-172.
11. Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. Single-channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. J Physiol 1987; 394: 173-200.
12. Bean BP. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology. J Gen Physiol 1985; 86: 1-30.
13. Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-volgate-activated Ca-channel currents in chick sensoty neurons. Differential sensitivity to dihydrophyridines and omega-conotoxin GVIA. Eur J Physiol 1989; 414: 150-156.
14. Plummer MR, Logothetis DE, Hess P. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. Neuron 1989; 2: 1.453-1.463.
15. Mintz IM, Adams ME, Bean BP. P-type calcium channels in central and peripheral neurons. Neuron 1992; 9: 1-20.
16. Randall AD, Wendland B, Schwetzer F, Miljanich G, Adams ME, Tsien RW. Five pharmacologically distinc high voltage-activated Ca^{2+} channels in cerebellar granule cells [resumen]. Soc Neurosci 1993; 19: 1.478.
17. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. Science 1994; 264: 107-111.
18. Kasai H, Aosaki T, Fukuda J. Presynaptic Ca-antagonist ω-conotoxin irreversibly blocks N-type Ca channels in chick sensory neurones. J Physiol 1987; 412: 181-195.
19. Llinás R, Sugimori M, Lin JW, Cherksey B. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider posion. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 1.689-1.693.
20. Scott RH, Sweeney MI, Kobrinsky EM, Pearson HA, Timms GH, Pullar IA, et al. Actions of arginine polyamine on voltage and ligand-activated whole cell currents recorded from cultured neurones. Br J Pharmacol 1992; 106: 199-207.
21. Adams ME, Bindokas VP, Hasagawa L, Venema VJ. ω-Agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (Agelenopsis aperta) venom. J Biol Chem 1990; 265: 861-867.
22. Mintz IM, Venema VJ, Swiderek K, Lee T, Bean BP, Adams ME. P-type calcium channels blocked by the spider toxin ω-Aga-IVA. Nature 1992; 355: 827-829.
23. Gandía L, Albillos A, García AG. Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. Biochem Biophys Res Commun 1993; 194: 671-676.
24. Albillos A, García AG, Gandía L. ω-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. FEBS Lett 1993; 336: 259-262.
25. Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature 1994; 367: 72-76.
26. Hillyard DR, Monje VD, Mintz IM, Bean BP, Nadasdi L, Ramachandran J et al. A new conus peptide ligand for mammalian presynaptic Ca^{2+} channels. Neuron 1992; 9: 69-77.
27. Monje VD, Haack JA, Naisbitt SR, Miljanich G, Ramachandran J, Nasdasdi L, et al. A new conus peptide ligand for Ca channel subtypes. Neuropharmacology 1993; 32: 1.141-1.149.
28. Adams ME, Myers RA, Imperial JS, Olivera BM. Toxityping rat bain calcium channels with ω-toxins from spider and cone snail venoms. Biochemistry 1993; 32: 12.566-12.570.
29. Sather WA, Tanabe T, Zhang JF, Mori Y, Adams ME, Tsien RW. Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel α_1 subunits. Neuron 1993; 11: 291-303.
30. Ceña V, Nicolás GP, Sánchez-García P, Kirpekar SM, García AG. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. Neuroscience 1983; 10: 1.455-1.462.
31. García AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frías J, Fonteriz RI et al. Dihydropyridine Bay K 8644 activates chromaffin cell calcium channels. Nature 1984; 309: 69-71.
32. Montiel C, Artalejo AG, García AG. Effects of the novel dihydropyridine Bay-K-8644 on adrenomedullary catecholamine release evoked by calcium reintroduction. Biochem Biophys Res Comm 1984; 120: 851-857.
33. Ballesta JJ, Palmero M, Hidalgo MJ, Gutiérrez LM, Reig JA, Viniegra S, et al. Separate binding and functional sites for ω-conotoxin and nitrendipine suggest two types of calcium channels in bovine chromaffin cells. J. Neurochem 1989; 53: 1.050-1.056.
34. Castillo CJF, Fonteriz RI, López MG, Rosenheck K, García AG. (+)PN200-110 and ouabain binding sites in purified bovine adrenomedullary plasma membranes and chromaffin cells. J Neurochem 1989; 53: 1.442-1.449.
35. Bossu JL, De Waard M, Feltz A. Inactivation characteristics reveal two calcium currents in adult bovine chromaffin cells. J Physiol 1991; 437: 603-620.
36. Bossu JL, De Waard M, Feltz A. Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. J Physiol 1991; 437: 621-634.
37. Artalejo CR, Dahmer MK, Perlman RL Fox AP. Two types of Ca^{2+} currents are found in bovine chromaffin cells: facilitation is due to the recruitment of one type. J Physiol 1991; 432: 681-707.
38. Artalejo CR, Mogul DJ, Perlman RL, Fox AP. Three

types of bovine chromaffin cell Ca^{2+} channels: facilitation increases the open probability of a 27 pS channel. J Physiol 1991; 444: 213-240.
39. Hans M, Illes P, Takeda K. The blocking effects of ω-conotoxin on Ca current in bovine chromaffin cells. Neurosci Lett 1990; 114: 63-38.
40. Artalejo CR, Perlman RL, Fox AP. ω-Conotoxin GVIA blocks a Ca^{2+} current in chormaffin cells that is not of the «classic» N Type. Neuron 1992; 8: 85-95.
41. Gandía L, López MG, Fonteriz RI, Artalejo CR, García AG. Relative sensitivities of chromaffin cell calcium channels to organic and inorganic calcium antagonists. Neurosci Lett 1987; 77: 333-338.
42. Gandía L, Michelena P, De Pascual R, López MG, García AG. Different sensitivities to dihydropyridines of catecholamine release from cat and ox adrenals. Neuro Report 1990; 1: 119-122.
43. Albillos A, Artalejo AR, López MG, Gandía L, García AG, Carbone E. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. J Physiol 1994; 477: 199-213.
44. López MG, Shukla R, García AG, Wakade AR. A dihydropyridine-resistant component in the rat adrenal secretory response to splanchnic nerve stimulation. J Neurochem 1992; 58: 2.139-2.144.
45. Gandía L, Borges R, Albillos A, García AG. Multiple types of calcium channels are present in rat chromaffin cells. J Physiol. En prensa.
46. Augustine GJ, Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. J Physiol 1992; 450: 247-271.

DISCUSIÓN

C. GONZÁLEZ: ¿Existe alguna relación entre el tipo de canal que expresan las distintas especies y la proporción de las diversas catecolaminas que secretan?

L. GANDÍA: En los últimos años hemos logrado cultivar separadamente las células que producen adrenalina y noradrenalina, pero no hemos conseguido todavía identificar la proporción de canales existente en cada una de ellas.

C. GONZÁLEZ: Y a falta de datos, ¿cuál es su opinión al respecto?

L. GANDÍA: Parece ser que la presencia de un determinado subtipo de canal controla la secreción, pero insisto en que no disponemos de datos experimentales sobre la secreción diferencial.

V. CEÑA: A mí me llama la atención el escaso porcentaje de bloqueo inducido por dihidropiridinas en corrientes bovinas. He observado que en la secuencia de bloqueadores siempre han aplicado furnidipino como último fármaco. ¿Qué ocurre si invierten el orden y en lugar de comenzar por ω-conotoxina GVIA comienzan por una dihidropiridina? Lo digo porque tanto en nuestro grupo como en otros hemos comprobado que con dihidropiridinas se puede observar un bloqueo de la corriente dependiente de las dosis que puede llegar hasta el 50%.

L. GANDÍA: También hemos hecho este tipo de experimentos pero, en estas gráficas, furnidipino siempre se empleaba generalmente al final, precisamente por su carácter reversible, después de los bloqueos irreversibles. Administrándolo al principio observamos en el mejor de los casos un 25,30% de bloqueo de las corrientes sin ningún tratamiento previo.

A.G. GARCÍA: ¿Cuánto tiempo de cultivo tenían las células que emplearon para estudiar el bloqueo con dihidropiridinas?

V. CEÑA: Las células tenían entre 36 y 60 h. Querría además comentar que intentamos obtener los registros en condiciones lo más parecidas posible a las fisiológicas; partimos de un potencial de fijación de −55 mV que es el potencial de membrana de la célula que nosotros medimos, e intentamos realizar el experimento administrando pulsos despolarizantes. En estas condiciones hemos logrado bloquear el 100% de la corriente simplemente combinando una dihidropiridina, nifedipino, y ω-agatoxina IVA. Esto enlaza con la cuestión más general de que las diferencias entre las clasificaciones de los distintos tipos de canales de calcio en los diferentes tejidos pueden tener mucho que ver con las condiciones de registro, en otras palabras, la apertura y cierre de los canales de calcio es obviamente voltajedependiente, y existen una serie de procesos como pueden ser fosforilaciones intracelulares capaces de condicionar el estado de activación y la contribución de esos canales a las corrientes. Además, tengo algunas dudas sobre la selectividad y especificidad de estos fármacos o toxinas en el sentido que dependiendo de la concentración pueden probablemente afectar a más de un tipo de canal.

L. GANDÍA: En relación con la pregunta del Dr. García sobre la edad de los cultivos estamos

observando últimamente que a medida que aumenta el tiempo de cultivo, podría estar cambiando la proporción de canales a favor de un incremento de canales N. Por otro lado, en nuestro grupo utilizamos un potencial de fijación de membrana de –80 mV, que quizá no sea el fisiológico, pero otro factor a considerar al evaluar el efecto de las dihidropiridinas es su voltajedependencia; de hecho, en los estudios en rata, al existir un componente L mayoritario, es donde hemos podido estudiar la voltajedependencia de furnidipino, observando diferencias de bloqueo del 40 a casi el 70% cambiando de –80 a –60 mV.

V. Ceña: Un simple comentario sobre la unión voltajedependiente de las dihidropiridinas. Obviamente las dihidropiridinas se unen a su receptor de forma voltajedependiente. De hecho, es posible bloquear el 100% de la secreción de catecolaminas con una dihidropiridina simplemente despolarizando ligeramente las células. Un potencial de –55 es equivalente al potencial de reposo de estas células, y cuando las células son estimuladas por un potencial de acción o por un agonista colinérgico parten de –55 mV y en estas condiciones el rango de activación de las corrientes se eleva a partir de –55 mV.

L Gandía: En este sentido creo que conviene establecer una diferenciación entre la funcionalidad de un canal y la presencia de un canal. Si realizamos esta serie de experimentos que usted ha comentado, a –55 mV la conclusión probablemente será que el canal N no está presente en la célula cromafín bovina cuando efectivamente sí lo está. Otra cosa es que al potencial de reposo de la célula el canal N sea funcional o no sea funcional o participe.

B. Soria: Quisiera saber cuántos tipos de canales de calcio hay.

L. Gandía: Nosotros también. En estos momentos los canales que se han descrito recientemente, O, P y Q, empiezan a ser controvertidos, y la tendencia es más que hablar de subtipos de canales independientes, hablar de una familia de canales. Lo que sí está claro es que hay un canal de bajo umbral y unos canales de alto umbral e incluso dentro del alto umbral se tiende ya a hablar de canales L y canales no L.

B. Soria: ¿Hay algún soporte molecular que efectivamente nos permita hablar de 2-3 grupos?

L. Gandía: La complejidad funcional de los canales de calcio puede complicarse todavía más desde el punto de vista de su biología molecular. El canal de calcio consta de varias subunidades y, por ejemplo, se han identificado hasta 6 subunidades alfa-1 que se han denominado A, B, C, D, E y S, con lo cual ya tenemos 6 subtipos de canales de alto umbral, si a esto le sumamos la posible complejidad de otras subunidades, podemos establecer una clasificación muy amplia de los canales de calcio.

F. Sala: Usted ha empezado hablando de cuatro criterios de clasificación: farmacología, activación, inactivación y conductancia, y se ha inclinado por la farmacología como el más útil. Sin embargo, creo que el uso exclusivo de este criterio conduce a conclusiones confusas, ya que si, como parece ser el caso, los canales sensibles a una toxina presentan varias conductancias, se plantean dudas acerca de la especificidad de dicha toxina.

L. Gandía: Es posible, pero lo cierto es que el criterio imperante en la actualidad es la caracterización farmacológica.

J. Marsal: Quisiera introducir un elemento más de complicación en el sistema, y es que a veces sabemos que hay un tipo de canal que es funcional, pero en cambio no hace la función que esperamos de él, es decir, activar la secreción del neurotransmisor, y este es uno de los casos que hemos descrito en los que hay canales N, y estos canales son funcionales, pero en cambio la ω-conotoxina GVIA es incapaz de inhibir la secreción de acetilcolina en esta preparación. Es decir, que quizás hay un efecto ligado a la ubicación de estos canales cerca de los lugares de secreción o bien a otro sistema que desconozco.

C. Montiel: Quisiera hacerle una pregunta en relación con el bloqueo de las corrientes de bario con distintas toxinas: ¿por qué utiliza 1 μmol de ω-conotoxina GVIA?

L. Gandía: En la mayoría de los trabajos con ω-conotoxina GVIA se utiliza una concentración de 1 μmol. Aparte puede haber también un criterio económico.

C. Montiel: Sin embargo, otros autores han utilizado concentraciones de esta toxina del orden de 5 μmol para asegurar un bloqueo completo de los canales de Ca^{2+} tipo N.

Canales de calcio sensibles a segundos mensajeros

J. García-Sancho

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid.

Homeostasis del calcio citosólico. Depósitos intracelulares de calcio

La concentración citosólica de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) se mantiene a un nivel muy bajo (10^{-7}M), aproximadamente cuatro órdenes de magnitud por debajo de la concentración de Ca^{2+} extracelular. Ciertas organelas intracelulares, que llamaremos genéricamente depósitos intracelulares de calcio (DIC), son capaces de acumular Ca^{2+} en su interior hasta alcanzar concentraciones similares a las del medio extracelular. La homeostasis del Ca^{2+} se logra regulando los flujos entre estos tres compartimientos, citosol, medio extracelular y DIC (fig. 1). El Ca^{2+} es continuamente bombeado desde el citosol hacia los otros compartimientos por ATPasas presentes en la membrana plasmática y en las endomembranas de los DIC con gasto de energía metabólica. En estas membranas existen también canales que dejan fluir Ca^{2+} en sentido inverso, siguiendo su gradiente de concentración. Durante el reposo los canales están cerrados, las ATPasas predominan y la $[Ca^{2+}]_i$ es baja. Durante la actividad los canales (bien en la membrana plasmática o bien en los DIC) se abren y el Ca^{2+} entra en el citosol, elevándose $[Ca^{2+}]_i$ y originándose una respuesta fisiológica. El control de $[Ca^{2+}]_i$ se lleva a cabo regulando la actividad de los canales Ca^{2+}. La variedad de canales de Ca^{2+} descritos es casi infinita. Esta revisión se centrará en los que son regulados por segundos mensajeros y, dentro de esta categoría, en aquellos que son comunes para un gran número de tipos celulares.

En muchos tipos celulares la interacción de un agonista con un receptor específico de la membrana plasmática da lugar a la génesis de un segundo mensajero que provoca una elevación de la $[Ca^{2+}]_i$, generalmente debida a la liberación de Ca^{2+} desde los DIC por apertura de canales presentes en las endomembranas. La idea dominante es que estos DIC son sensibles a segundos mensajeros con porciones modificadas del retículo endoplásmico, aunque su naturaleza exacta y su localización puede variar de unas células a otras[1-3]. Las mitocondrias son también capaces de almacenar y liberar calcio, pero parecen operar a $[Ca^{2+}]_i$ muy por encima de los valores de reposo. Pueden, por tanto, cooperar amortiguando elevaciones transitorias de $[Ca^{2+}]_i$ generadas por otros mecanismos o almacenar calcio en condiciones de sobrecarga, pero no se cree que desempeñen un papel principal en el control de $[Ca^{2+}]_i$.

En condiciones de reposo los canales están cerrados y las bombas predominan, lo que conduce a la generación de un gradiente de Ca^{2+} dirigido desde los DIC hacia el citosol (fig. 2).

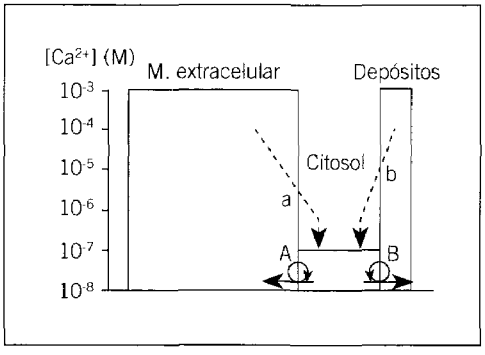

Fig. 1 Regulación de la concentración de Ca^{2+} citosólico. Se representa el compartimiento citosólico separado del medio extracelular y de los depósitos intracelulares de calcio por las correspondientes membranas. Las bombas (A y B) transportan el Ca^{2+} contragradiente de concentración desde el citosol hacia los otros compartimientos. Los canales (a y b, líneas de puntos) dejan entrar el Ca^{2+} en el citosol disipando el gradiente de concentración. En las ordenadas, concentración de Ca^{2+} (M) en escala logarítmica. El tamaño de los depósitos es mucho menor que el del compartimiento extracelular. Si se abre solamente el canal «b» los depósitos se vacían hacia el citoplasma, donde aumentará la concentración de Ca^{2+} transitoriamente, ya que la bomba «A» transporta rápidamente el Ca^{2+} hacia el medio extracelular. La apertura del canal «a» ocasiona, por el contrario, un aumento mantenido de la $[Ca^{2+}]_i$, ya que el compartimiento extracelular es de mucho mayor tamaño que el extracelular.

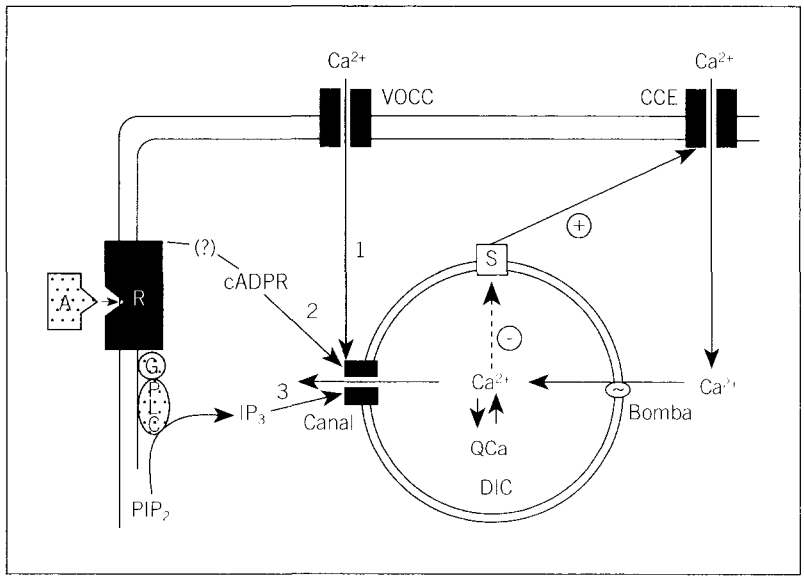

Fig. 2. Vaciamiento y llenado de los depósitos intracelulares de calcio (DIC). VOCC: canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes; CCE: entrada de Ca^{2+} capacitativa; A: agonista; R: receptor; PLC: fosfolipasa C, acoplada al receptor a través de una proteína G. A la izquierda se representan tres mecanismos de control del vaciamiento de los DIC (canales): 1) liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR); 2) ADP-ribosa cíclica (cADPR), y 3) inositol trisfosfato (TP_3). La Ca^{2+}-ATPasa, a la derecha (bomba) bombea el Ca^{2+} desde el citosol a los depósitos. QCa representa calcio ligado a las proteínas fijadoras de Ca^{2+} dentro de los depósitos. S es un sensor localizado en la membrana de los DIC, que es inhibido por Ca^{2+}. Cuando los DIC se vacían S es desinhibido y produce un mensajero capaz de activar CCE.

El tamponamiento por proteínas fijadoras de Ca^{2+} presentes dentro de los DIC (QCa en la fig. 2) permite el almacenamiento de grandes cantidades de Ca^{2+} con un aumento relativamente modesto de $[Ca^{2+}]$. Cuando los canales se abren, el Ca^{2+} es liberado al citosol y la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta. Este aumento de $[Ca^{2+}]_i$ es transitorio, ya que la cantidad de Ca^{2+} almacenada en los depósitos es limitada y el Ca^{2+} liberado al citosol es rápidamente bombeado al medio extracelular por la ATPasa de la membrana plasmática (fig. 1). En muchas células el vaciamiento de los depósitos intracelulares es detectado por un sensor (S en la fig. 2) que es capaz de abrir, por un mecanismo desconocido, canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Esto causa entrada en Ca^{2+} desde el medio extracelular (entrada capacitativa de Ca^{2+} [CCE])[4], lo que mantiene la $[Ca^{2+}]_i$ elevada mientras los DIC están vacíos. Una vez que los canales de los DIC se cierran, el Ca^{2+} se bombea desde el citosol hacia los DIC, y, cuando estos se han rellenado, la CCE cesa y la $[Ca^{2+}]_i$ desciende a los valores de reposo (fig. 2). Así pues, la interacción de un agonista con un receptor de membrana provoca generalmente un aumento bifásico de $[Ca^{2+}]_i$ compuesto de un aumento rápido y transitorio por liberación de Ca^{2+} desde los DIC y una elevación mantenida debida a la entrada desde el medio extracelular a través de la vía capacitativa[5]. Incluso en la situación de reposo el escape de Ca^{2+} desde los DIC hacia el citosol es relativamente rápido, ya que inhibidores selectivos de la ATPasa de los DIC, como la tapsigargina[6] o el ácido ciclopiazónico[7] causan el vaciamiento completo de los DIC en pocos minutos.

Liberación de calcio de los depósitos intracelulares

Se conocen dos familias de canales de Ca^{2+} de los DIC, los receptores de ryanodina (RyRs) y los receptores de inositol-trisfosfato (IP_3Rs). Ambos tipos de canales, que pueden coexistir en una misma célula, tienen una gran homología de secuencia, y podrían derivar de una proteína ancestral común, pero el mensajero que controla su activación es distinto[1].

Los receptores de ryanodina[3,8-11] se llaman así porque son capaces de ligar con alta afinidad este alcaloide. La unión de ryanodina al RyR estabiliza un subestado parcialmente abierto del canal, que conduce al vaciamiento de este

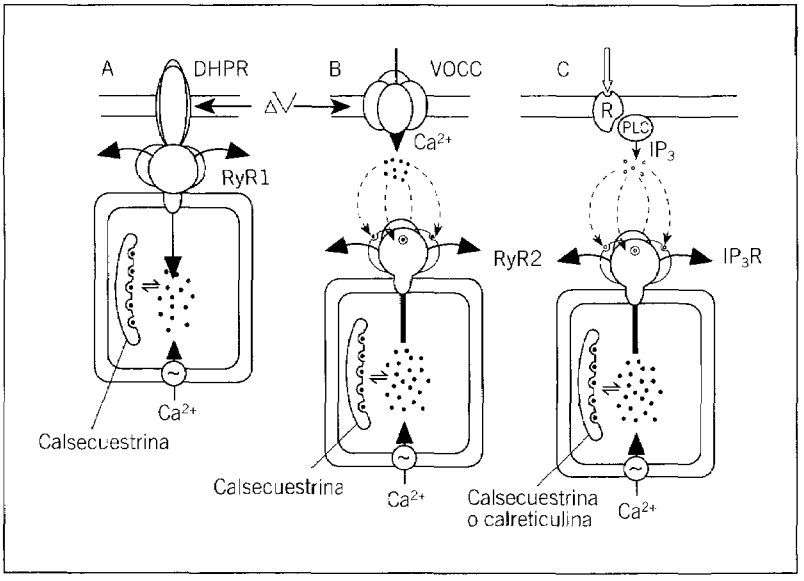

Fig. 3. Liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. En los 3 casos existe un receptor tetramérico de estructura muy similar en la membrana de los DIC. A: RyR1 del retículo sarcoplásmico (RS) del músculo esquelético; forma un pie con el receptor dihidropiridínico (DHPR) del túbulo T, que responde a la despolarización de la membrana (AV) y sufre un cambio de conformación que se transmite a la cabeza de RyR y abre el canal de Ca^{2+} del RS; B: liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) en el músculo cardíaco y quizá en algunas neuronas; la apertura de un canal de Ca^{2+} voltajedependiente (VOCC) de la membrana plasmática en respuesta a AV deja entrar una pequeña cantidad de Ca^{2+} que abre RyR2, liberándose Ca^{2+} de los depósitos que amplifica la señal inicial; C: IP_3R, la interacción del agonista (A) con un receptor de la membrana da lugar a la generación de IP_3 que alcanza los depósitos intracelulares movilizando el Ca^{2+} que contienen. Tomada de Berridge MJ[1].

TABLA I
EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE RYANODINA

Tejido	*RyR1*	*RyR2*	*RyR3*
Músculo esquelético	+ + + +	—	+
Corazón	—	+ + + +	+ / —
Cerebro	+	+ + +	+
Hígado	—	—	+ / —
Estómago	—	+ / —	+
Riñón, pulmón, bazo, duodeno, íleon	—	—	+

tipo de DIC. Se conocen tres tipos de RyRs (tabla I)[11]. El RyR1 es el canal de Ca^{2+} de los DIC del músculo esquelético (fig. 3A). En el músculo esquelético la señal que libera el Ca^{2+} almacenado es la despolarización de la membrana plasmática. La despolarización es detectada por un receptor dihidropiridínico (DHPR) presente en la membrana de los túbulos T. El cambio conformacional del DHPR se transmite físicamente al RyR1 presente en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS) y da lugar a la apertura del canal, la liberación de Ca^{2+} al sarcoplasma y la contracción muscular[9,10].

En el músculo cardíaco el canal de Ca^{2+} de los DIC es el RyR2 (fig. 3B)[10,11]. El canal asociado a RyR2 se abre por el aumento súbito de la $[Ca^{2+}]$ en su entorno inmediato. En este caso, una pequeña cantidad de Ca^{2+} que entra a través de canales de Ca^{2+} voltajedependientes (VOCC) presentes en la membrana plasmática y activados por su despolarización dispara la apertura del canal asociado a RyR2 y la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} desde el RS. Este proceso se conoce como liberación de calcio activada por Ca^{2+} (CICR)[12,13]. Muchas células nerviosas poseen también RyR2 (ta-

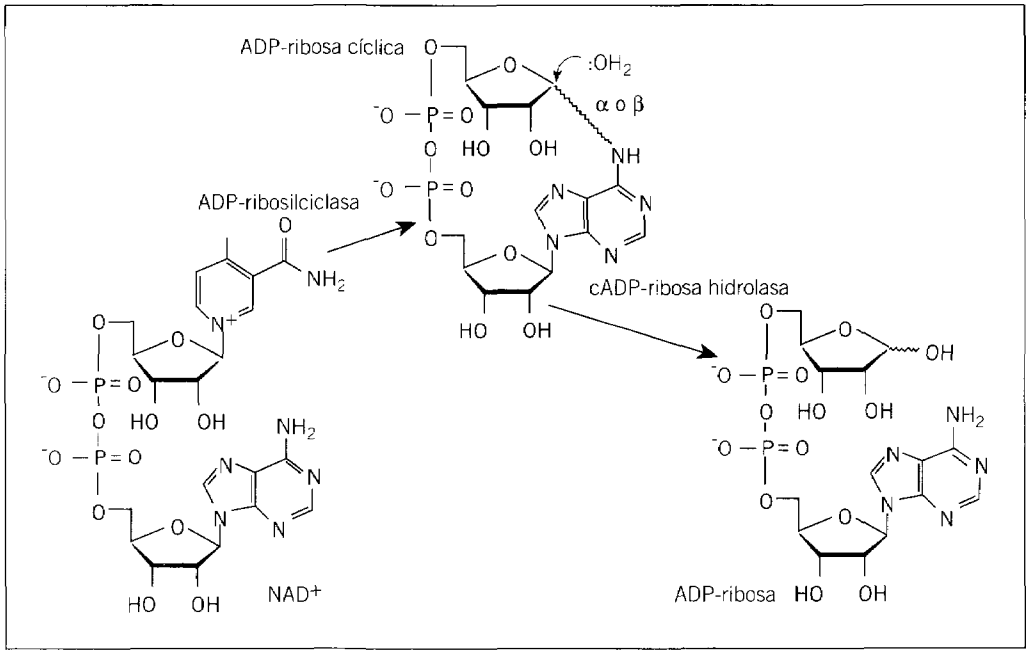

Fig. 4. Síntesis y catabolismo de la ADP-ribosa cíclica.

bla I)[11], y se ha propuesto que el CICR podría contribuir a amplificar los aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ originados por activación de los VOCC en las células nerviosas[14].

La cafeína estabiliza el estado abierto de los canales asociados a los RyRs, facilitando así la activación de las células que los poseen. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que este no es el único efecto farmacológico de la cafeína. Este fármaco inhibe también las fosfodiesterasas, elevando así los valores de nucleótidos cíclicos, e interfiere con la activación de VOCC. El dantroleno bloquea la liberación de Ca^{2+} de los DIC asociados a RyRs, pero podría tener también otros efectos secundarios.

Recientemente se ha demostrado que RyR2 está sujeto también a modulación por un mensajero químico, la ADP-ribosa cíclica (cADPR)[15]. Este mensajero se produce a partir de NAD^+ por acción de la enzima ADP-ribosilciclasa (fig. 4), ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos. La cADPR es capaz de activar los canales asociados a RyR2 en parches de membrana de RS a $[Ca^{2+}]$ de reposo y de inducir liberación de ^{45}Ca de vesículas de RS, pero no de microsomas de cerebro[16]. Su mecanismo de acción parece ser aumentar la sensibilidad al Ca^{2+} del CICR. En las células B pancreáticas cADPR también induce liberación de Ca^{2+} de los DIC y su síntesis es estimulada por el aumento de la concentración de glucosa, por lo que se ha propuesto que podría estar implicada en el control de la secreción de insulina[17].

Se ha identificado un RyR3 que se expresa ampliamente en muchos tipos celulares (tabla I)[11]. Su función es desconocida. Difiere de los otros RyRs en que no es sensible a cafeína.

Los IP_3Rs tienen una distribución casi universal en las células animales[3,4]. Se conoce una gran variedad de agonistas extracelulares que son capaces, interaccionando con receptores de membrana específicos, de activar una fosfolipasa C (PLC) específica de fosfatidil-inositol (tabla II). La PLC, actuando sobre el fosfatidil-inositol-bisfosfato produce inositol-trisfosfato (IP_3) y diacilglicerol, un activador de la proteincinasa C. El IP_3 interacciona con los IP_3Rs y produce liberación de Ca^{2+} de los DIC. La sensibilidad de los IP_3Rs al IP_3 puede variar dependiendo del subtipo de receptor (se conocen cinco variedades), grado de fosforilación, entorno lipídico, contenido de Ca^{2+} de los DIC y $[Ca^{2+}]$ en la vecindad. La heparina inhibe los IP_3Rs, pero no se conocen inhibidores selectivos capaces de atrave-

TABLA II
RECEPTORES LIGADOS A FOSFOLIPASA C ESPECÍFICA DE FOSFATIDIL-INOSITOL

Transducción por proteína G y PLCβ1
Acetilcolina, histamina, noradrenalina, serotonina, ATP, PAF, glutamato, angiotensina II, vasopresina, bradicinina, sustancia P, bombesina, neuropéptido Y, trombina, colecistocinina, endotelina, neuromedina, TRH, GnRH, PTH
Odorantes
Luz
Transducción por receptores ligados a tirosincinasa y PLCγ1
Factores de crecimiento epidérmico (EGF) y derivado de plaquetas (PDGF)
Antígenos (linfocitos T)

sar la membrana celular. Se ha descrito la presencia de otros inositoles-fosfato y de las enzimas necesarias para su metabolismo en las células animales. Para algunos de ellos se han propuesto funciones de segundos mensajeros[1,18].

Entrada capacitativa de Ca^{2+}

Como se ha comentado anteriormente, las señales que resultan de la activación de la PLC son bifásicas[5]. Se ha propuesto que la fase tardía de entrada de Ca^{2+} podría estar mediada también por IP_3, por uno de sus derivados (IP_4) o por la acción concertada de ambos[18]. Sin embargo, la evidencia experimental para esta hipótesis es contradictoria. Se ha demostrado, por otro lado, que el vaciamiento de los DIC por maniobras que no aumentan la síntesis de inositoles-fosfato (tapsigargina, ionóforos de Ca^{2+}, incubación prolongada en medio sin Ca^{2+}) activan la entrada plasmática de Ca^{2+} tanto o más que los agonistas naturales[4]. A partir de estas observaciones, se ha propuesto que el vaciamiento de los DIC daría origen a la producción de un mensajero que activaría una vía de entrada de Ca^{2+} de la membrana plasmática (CCE; fig. 2)[4]. Así pues, la mayor parte de la entrada de Ca^{2+} inducida por los agonistas fisiológicos sería un tanto indirecta, secundaria al vaciamiento de los DIC que inducen[19]. Este complejo mecanismo asegura que: *1)* $[Ca^{2+}]_i$ permanece elevada mientras el agonista está presente; *2)* cuando el agonista desaparece, $[Ca^{2+}]_i$ permanece elevada por un tiempo hasta que se rellenan los depósitos intracelulares y se cierra la vía capacitativa. Se ha demostrado la existencia de CCE en un gran número de células[4]. La naturaleza del canal responsable de la entrada de Ca^{2+} es desconocida. Recientemente se ha demostrado en mastocitos y otros tipos celulares la existencia de una corriente de entrada de Ca^{2+} que se activa por vaciamiento de los DIC (I_{CRAC}), que muy probablemente es resonsable de la CCE[20-22].

El mecanismo de activación de la CCE es desconocido. Entre los candidatos propuestos figuran los inositoles-fosfato[1,18], el GMP cíclico[23], un metabolito producido por el citocromo P450[24], o un factor de naturaleza desconocida que se coliberaría y se coacumularía con el Ca^{2+} en los DIC (*Calcium influx factor* [CIF])[25]. No existen, por el momento bloqueadores selectivos de la CCE. Los inhibidores del citocromo P450, particularmente los derivados imidazólicos sustituidos en N_1, bloquean la CCE[24,26], pero inhiben también la entrada a través de canales de Ca^{2+} voltajedependientes[27]. La CCE puede modularse negativamente por fosforilación[28].

Rellenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+}

Se propuso inicialmente que, tras la liberación del Ca^{2+}, los DIC podrían rellenarse directamente utilizando Ca^{2+} extracelular a través de la vía capacitativa. Sin embargo, se ha demostrado posteriormente que el rellenado de los DIC sucede por bombeo del Ca^{2+} desde el citosol, una vez que los canales de Ca^{2+} de los DIC se cierran[4,29]. Los tiempos medidos para el semirellenado de los depósitos oscilan entre 4 s para los timocitos a 30-60 s para neutrófilos y células leucémicas[19,30,31]. Ya que la velocidad de bombeo de Ca^{2+} aumenta exponencialmente con su concentración, la $[Ca^{2+}]_i$ debe ser un determinante importante de la velocidad de rellenado de los depósitos. La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es esencial para mantener $[Ca^{2+}]_i$ elevada y, así, permitir un rellenado adecuado de los depósitos. Esto es garantizado por la CCE, que se mantiene activada mientras los depósitos están vacíos y se cierra una vez que se han llenado[19]. Cuando se

bloquea CCE el rellenado de los depósitos es muy lento ya que, al bombearse el Ca^{2+} citosólico a los DIC, disminuye la $[Ca^{2+}]_i$ y la ATPasa de los DIC deja de bombear. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ se mantiene elevada por otros motivos (p. ej., por activación de otros canales de la membrana plasmática) y los canales de los DIC están cerrados, los DIC (y quizás otros orgánulos intracelulares como las mitocondrias) se sobrecargan con Ca^{2+}.

Conclusión

La activación celular por agonistas conlleva un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ bifásico, con un componente rápido y transitorio, debido a liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (DIC), y otro más tardío y mantenido, debido a entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. En ambos casos, el mecanismo incluye la apertura de canales selectivos presentes en la correspondiente membrana. Existen dos tipos de canales en la membrana de los DIC, los receptores de inositol-trisfosfato y los receptores de ryanodina. Estos últimos se activan por cambios del potencial de membrana o de la $[Ca^{2+}]$ en su entorno, pero son también regulados por un mensajero químico, la ADP-ribosa cíclica. La entrada tardía de Ca^{2+} se debe a la apertura de un canal de la membrana plasmática, que es activado por un mediador desconocido que se produce en los DIC cuando estos se depletan de Ca^{2+}. La existencia de esta vía de entrada capacitativa de Ca^{2+} asegura la prolongación en el tiempo de la señal de Ca^{2+} inducida por el agonista y un rellenado adecuado de Ca^{2+} una vez que la acción del agonista cesa.

Agradecimiento

Algunas de las investigaciones recogidas en este artículo fueron financiadas por la DGICYT (Proyecto PB92-0268).

BIBLIOGRAFÍA

1. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 1993; 361: 315-325.
2. Rossier MF, Putney JW. The identity of the calcium-storing, inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive organelle in non-muscle cells: calciosome, endoplasmic reticulum... or both? Trends Neurosci 1991; 14: 310-314.
3. Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores and oscillations. Ann Rev Cell Biol 1990; 715-760.
4. Putney JW, Bird GS. The inositol phosphate-calcium signalling system in non-excitable cells. Endocrine Rev 1993; 14: 611-631.
5. Putney JW. Calcium-mobilizing receptors. Trends Pharmacol Sci 1987; 8: 481-486.
6. Thastrup O. Role of Ca^{2+}-ATPases in regulation of cellular Ca^{2+} signalling, as studied with the selective microsomal Ca^{2+}-ATPase inhibitor thapsigargin. Agents Actions 1990; 29: 8-15.
7. Demaurex N, Lew DP, Krause KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular Ca^{2+} stores and activates an influx pathway for divalet cations in HL60 cells. J Biol Chem 1992; 267: 2.318-2.324.
8. Fill M, Coronado R. Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. Trends Neurosci 1988; 11: 453-457.
9. Ríos E, Pizarro G. Voltage receptors and calcium channels of excitation-contraction coupling. News Physiol Sci 1988; 3: 223-227.
10. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysiscs of excitation-contraction coupling. Ann Rev Biophys Biophys Chemistry 1989; 18: 333-364.
11. Sorrentino V, Volpe P. Ryanodine receptors: how many, where and why? Trends Pharmacol Sci 1993; 14: 98-103.
12. Valdeolmillos M, O'Neill SC, Smith G, Eisner DA. Calcium-induced calcium release activates contraction in intact cardiac cells. Plügers Arch 1989; 413: 676-678.
13. Gyorke S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release in heart. Science 1993; 260: 807-809.
14. Friel DD, Tsien RY. Phase-dependent contributions from Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release to caffeine-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in bullfrog sympathetic neurons. Neuron 1992; 8: 1.109-1.125.
15. Galione A. Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release and its modulation by cyclic ADP-ribose. Trends Pharmacol Sci 1993; 13: 304-306.
16. Mszaros LG, Bak J, Chu A. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. Nature 1993; 364: 76-79.
17. Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic β cells. Science 1993; 259: 370-373.
18. Irvine RF. Inositol-phosphates and Ca^{2+} entry: towards a proliferation or a simplification? FASEB J 1992; 6: 3.085-3.091.
19. Montero M, Álvarez J, García-Sancho J. Agonist-induced calcium influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. Biochem J 1991; 227: 73-79.
20. Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. Nature 1992; 355: 353-355.
21. Hotth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. J Physiol 1993; 465: 359-386.
22. Fasolato C, Innocenti B, Pozzam T. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? Trends Pharmacol Sci 1994; 15: 77-83.

23. Bahnson TD, Pandol SJ, Dionne VE. Cyclic GMP modulates depletion-activated Ca^{2+} entry in pancreatic acinar cells. J Biol Chem 1993; 268: 10.808-10.812.
24. Álvarez J, Montero M, García-Sancho J. Cytochrome P450 may regulate plasma membrane Ca^{2+} permeability according to the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores. FASEB J 1992; 6: 786-792.
25. Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx. Nature 1993; 364: 809-814.
26. Montero M, García-Sancho J, Álvarez J. Comparative effects of cytochrome P-450 inhibitors on Ca^{2+} and Mn^{2+} entry induced by agonists or by emptying the Ca^{2+} stores of human neutrophils. Biochim Biophys Acta 1993; 17: 127-133.
27. Villalobos C, Fonteriz R, López MG, García AG, García-Sancho J. Inhibition of voltage-gated Ca^{2+} entry into GH3 and chromaffin cells by imidazole antimycotics and other cytochrome P_{450} blockers. FASEB J 1992; 6: 2.742-2.747.
28. Montero M, García-Sancho J, Álvarez J. Phosphorylation down-regulates the calcium store-operated calcium entry pathway of human neutrophils. J Biol Chem 1994; 269: 3.963-3.967.
29. Montero M, Alonso-Torre SR, Álvarez J, Sánchez A, García-Sancho J. The pathway for refilling the intracellular Ca^{2+} stores passes through the cytosol in human leukemia cells. Plügers Arch 1993; 424: 465-469.
30. Montero M, Álvarez J, García-Sancho J. Control of plasma membrane Ca^{2+} entry by the intracellular Ca^{2+} stores. Kinetic evidence for a short-lived mediator. Biochem J 1992; 288: 519-525.
31. Alonso-Torre SR, Álvarez J, Montero M, Sánchez A, García-Sancho J. Control of Ca^{2+} entry into HL60 and U937 human leukemia cells by the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores. Biochem J 1993; 289: 761-766.

DISCUSIÓN

B. Soria: ¿Cuántos tipos de I_{CRAC} hay, y qué relación de permeabilidad existe entre calcio y sodio?

J. García-Sancho: I_{CRAC}-Ch viene de *Calcium release activated calcium channel*. Este canal es selectivo para el calcio, y prácticamente no transporta sodio ni bario. La opinión actual es que el I_{CRAC} es el implicado en esta entrada capacitativa de la que hemos hablado.

F. Barros: Usted se ha ceñido mucho a células no excitables, pero en células excitables hay otras posibilidades, ¿qué relación podría haber en células excitables entre señal de depósitos durante la segunda fase de entrada de calcio frente a un mecanismo indirecto de activación, por ejemplo, de actividad eléctrica por vía canales de potasio o por vía otros mecanismos, que no sea precisamente un mecanismo de mensajero intracelular procedente de depósitos?

J. García-Sancho: En algunas células excitables, por ejemplo, en células cromafines, se ha descrito este tipo de mecanismos que se activan al vaciar los depósitos. Es más difícil de evaluar porque en este caso existe el ruido de fondo de los canales voltajedependientes. Quizá la suma de mecanismos sea más efectiva para provocar secreción en el sentido de que los picos deben ser más marcados pero realmente se dispone de muy pocos datos en células excitables.

F. Barros: ¿Se podría realmente eliminar de alguna manera la necesidad de esta entrada de calcio externo y conseguir que el mensajero intracelular funcionara de manera totalmente independiente en células excitables?

J. García-Sancho: Si usted elimina el calcio exterior no puede tener lugar entrada de calcio. Se sabe que en muchas células la liberación se produce sin calcio externo.

F. Barros: Sí, pero no se mantiene. A largo plazo no tenemos ninguna evidencia de que la liberación de depósitos pueda seguir funcionando, sin entrada de calcio externo.

C. Montiel: Se sabe que existe un receptor de ryanodina 2 cardíaco que se activa por el calcio que entra por canales de Ca^{2+} tipo L acoplados directamente con este receptor. Sin embargo, usted se ha referido a un segundo mensajero, la ADP-ribosa cíclica. ¿Funcionaría de forma coordinada el calcio que entra con este segundo mensajero?, ¿en qué porcentaje participaría cada uno de estos dos sistemas?

J. García-Sancho: Esto es especulativo, ya que nadie ha medido ambos sistemas de forma simultánea. Ahora bien, la complejidad no termina aquí. En células nerviosas, por ejemplo,

hay quien piensa que los mecanismos de liberación a través del receptor de rianodina 2 son importantes, pero no se descarta la posibilidad de un mensajero químico que esté cambiando el umbral o el *set point* de todo el sistema. Los factores que controlan las enzimas que sintetizan la ADP-ribosa cíclica son todavía mal conocidos. Existe además un tercer receptor de ryanodina de distribución universal que es insensible a la cafeína y cuya función se desconoce.

J. TAMARGO: ¿Cuál sería, en términos generales, según su experiencia, el agonista que pone en marcha más fácilmente el mecanismo de vaciamiento de los depósitos?

J. GARCÍA-SANCHO: En cada caso concreto habrá que emplear el que sea más potente y se desensibilice menos; puede ser también que uno de ellos se desensibilice y al cabo de pocos segundos se estén rellenando otra vez los depósitos. Es difícil concretar más ya que depende de la preparación utilizada.

Relación estructura química-actividad farmacológica de los moduladores de los canales de calcio

C. Sunkel, M. Fau de Casa-Juana, L. Santos, M.M. Gómez, J. Priego, M.P. Ortega y A. García*

Departamento de Investigación. ALTER S.A. Madrid y *Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

La modulación farmacológica de la actividad de los canales lentos de calcio voltajedependientes tuvo su origen en el hallazgo de Fleckenstein[1] al comprobar que el verapamilo disminuía la contractilidad cardíaca y que un exceso de Ca^{2+} contrarrestaba dicho efecto, acuñando el término de antagonista del Ca^{2+} para definir a los fármacos que eran capaces de impedir la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de los canales iónicos.

Desde entonces, las 4-aril-1,4-dihidropiridinas (1,4-DHP) se han convertido en el grupo más importante de antagonistas del calcio. Estos compuestos son potentes vasodilatadores arteriolares con efectos relativamente insignificantes sobre el corazón[2]. Además, se ha descrito un nuevo grupo de 1,4-DHP que aumenta la entrada de calcio. Estos activadores de los canales de calcio representan un nuevo grupo de compuestos con potentes efectos vasoconstrictores y con actividad cardíaca inotrópico-positiva[3].

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado en los últimos años en la modificación del anillo de 1,4-DHP a la búsqueda de nuevas actividades asociadas a este núcleo. Así, se han sintetizado 4-aril-1,4-DHP con potentes actividades cardiovasculares y cerebrovasculares[4], así como derivados con actividad vasoconstrictora y vasorrelajante[5]. Uno de ellos presenta interesantes propiedades sobre diversos parámetros cardiovasculares actuando como agonista del calcio[5,6].

Por otra parte, hemos modificado la estructura de 1,4-DHP sustituyendo el resto aromático de la posición 4 por un resto alquilo. Así, se han conseguido nuevas series de compuestos que presentan una interesante actividad antitrombótica[7] y antagonista del factor de activación plaquetaria (PAF)[8].

4-aril-1,4-dihidropiridinas como calciomoduladores

Nuestro primer objetivo de búsqueda de una nueva 4-aril-1,4-DHP se dirigió hacia la síntesis de una estructura «clásica» del tipo de nifedipino, es decir, que reuniera los requisitos estructurales de un antagonista del calcio. Estos requisitos fueron inicialmente definidos por Loev[9] y son, básicamente, los siguientes:

La actividad aumenta con la sustitución en la posición 4 del anillo en la secuencia H < Me < cicloalquilo < heterociclo < fenilo < fenilo sustituido.

La sustitución en el átomo de N, así como la oxidación del anillo, provoca la pérdida casi total de la actividad.

Los grupos ésteres en las posiciones 3 y 5 del anillo son los óptimos para la actividad.

De esta manera llegamos a la síntesis de un compuesto denominado «furnidipino»[10], cuya estructura está recogida en la figura 1.

Este compuesto tiene la particularidad estructural de presentar dos centros quirales, señalados en la fórmula (con asteriscos), con lo cual existen 4 isómeros ópticos.

La obtención a escala industrial de este compuesto produce un racemato RR/SS con una riqueza superior al 99%. La síntesis de los cuatro diastereoisómeros[11] ha permitido llevar a cabo los ensayos del desplazamiento de la unión de ^{3}H-isradipino en íleon de cobaya de cada uno de ellos, siendo el orden de afinidad el siguiente: SS > SR > RR > RS[12]. De estos datos se desprende que los estereoisómeros más activos son aquellos que presentan la configuración S para el C4 del anillo de DHP, dato que concuerda con lo publicado en la literatura sobre 1,4-DHP, en la que se observa que los enantiómeros S son más activos que los R[13].

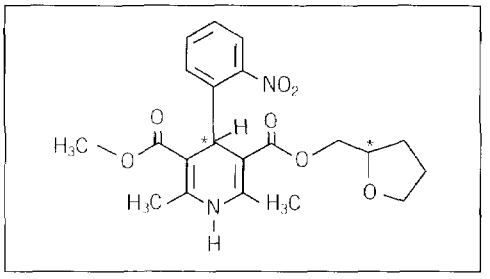

*Fig. 1. Furnidipino; *centros quirales.*

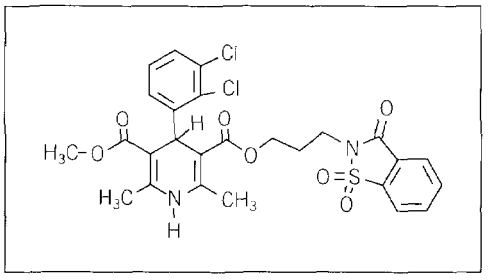

Fig. 2. PCA-50938.

El furnidipino es 10 veces más potente que el nifedipino relajando la aorta de rata y 358 veces más potente en la arteria coronaria de cerdo despolarizada con potasio. El producto aumentó el flujo coronario a dosis inferiores a las del nifedipino y la duración de acción fue más prolongada.

Fue significativamente más activo en venas mesentéricas de pequeño diámetro que en las correspondientes arterias mesentéricas, mientras que el nifedipino no demostró ningún efecto diferencial. Los resultados en diversos vasos demostraron una alta selectividad del furnidipino por los lechos vasculares.

Los estudios hemodinámicos demostraron que el furnidipino reduce la forma dosisdependiente, tanto la poscarga como la presión telediastólica del ventrículo izquierdo y la precarga, aumentando de esa forma el gasto cardíaco. En pacientes con angina estable, su administración intravenosa ha demostrado una buena tolerancia, ausencia de inotropía negativa apreciable, reducción del trabajo del corazón al disminuir la resistencia periférica y el retorno venoso, aumento del índice cardíaco al incrementar el trabajo del ventrículo izquierdo, sin influencia en la frecuencia cardíaca que sólo aumenta, junto con la mayor disminución de las presiones sistólica y diastólica, a las dosis más altas.

En contraste con otros antagonistas del calcio como el verapamilo, el diltiazem y el bepridilo, el furnidipino no afecta la conducción auriculoventricular y, por tanto, puede ser prescrito a pacientes en los que aquellos fármacos están contraindicados.

La ausencia de actividad inotrópica negativa y la no afectación de la conducción del nódulo auriculoventricular y de la frecuencia cardíaca permiten el uso conjunto del furnidipino con bloqueadores beta.

En modelos animales de isquemia inducida por ligadura de arteria coronaria, el furnidipino previno completamente la mortalidad y la fibrilación ventricular tras situaciones de isquemia-reperfusión. En un modelo de infarto de miocardio inducido por isoproterenol, disminuyó la mortalidad y redujo sustancialmente el área de infarto.

El furnidipino mostró una buena tolerancia y un buen perfil farmacológico de seguridad, así como muy baja toxicidad a largo plazo. Posee un margen de seguridad superior a los representantes de la segunda generación de antagonistas del Ca^{2+}.

El furnidipino posee las características de un fármaco de elección en la prevención y el tratamiento de diferentes situaciones clínicas asociadas a lesión miocárdica tales como angina de esfuerzo estable, angina inestable, angioplastia coronaria, infarto agudo de miocardio con reperfusión tras trombólisis, cirugía cardíaca y trasplante cardíaco.

El campo en el que el furnidipino pudiera convertirse en el primer agente terapéutico realmente nuevo y original es el de la protección de la muerte súbita cardíaca.

Basándonos en experiencias previas, decidimos introducir el resto de 1,2-benzisotiazol-3-ona-1,1-dióxido en la cadena lateral de una 1,4-DHP, conservando los demás patrones de sustitución clásicos en el anillo. De esta forma se obtuvieron una serie de derivados, de entre los cuales destaca el compuesto cuya clave de laboratorio es PCA-50938[5] (fig. 2).

El PCA-50938 posee una relación de selectividad tisular vasos/corazón muy alta (686) en comparación con el nifedipino (39) e incluso el felodipino (126). La selectividad también se muestra en vasos cerebrales cuando se compara con arterias femorales o mesentéricas. Por medio de la utilización de técnicas de radioligando se ha demostrado que posee una mayor afinidad en el cerebro que el nifedipino y el felodipino.

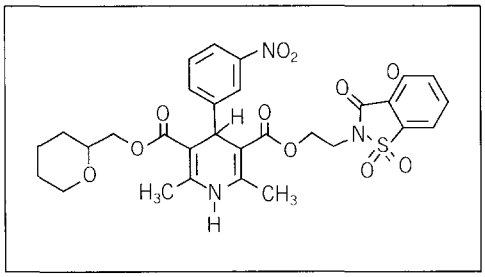

Fig. 3. PCA-50941.

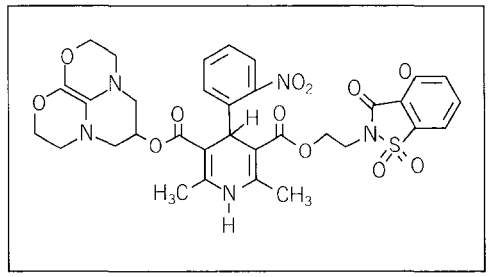

Fig. 4. PCA-50982.

Por otro lado, la instauración del efecto vasodilatador y la reversibilidad de su efecto son mucho más lentas que las de nifedipino.

El PCA-50938 posee actividad protectora frente a la isquemia cerebral. Este efecto ha sido demostrado en varios modelos experimentales de isquemia realizados en ratones, gerbos y cabra consciente, donde el PCA-50938 aumentó el flujo sanguíneo cerebral y la supervivencia de los animales en estudio, así como también disminuyó el número de neuronas lesionadas por la anoxia.

Cabe destacar que este producto es sustancialmente menos potente como hipotensor que el nisoldipino y el felodipino en diversos modelos de hipertensión en rata. En conjunto, además, el aumento de la frecuencia cardíaca producido por el PCA-50938 es menor que el inducido por el felodipino y el nisoldipino.

Por otra parte, se observó, sorprendentemente, que uno de los compuestos de esta serie, cuya clave de laboratorio es PCA-50941 (fig. 3), presentaba efecto vasoconstrictor y aumentaba la presión arterial[5,6].

Desde el punto de vista estructural, hay que destacar que este compuesto vasoconstrictor difiere de los agonistas del calcio descritos hasta el momento. Puede observarse que nuestro compuesto presenta dos restos ésteres en las posiciones 3 y 5 del anillo de 1,4-DHP. Uno de ellos está unido al resto de benzisotiazolona a través de un puente etilénico y el otro a un resto de 2-metiltetrahidropirano. Ninguno de los agonistas descritos hasta ahora presenta este patrón de sustitución, ya que en concreto el Bay K 8644[3] incorpora un grupo nitro en la posición 3 del anillo, el CGP 28392[14] es una lactona y el YC 170[15] es una amida. Por ello, este nuevo compuesto se suma al heterogéneo grupo de agonistas del calcio.

Se han llevado a cabo cálculos teóricos[16] y comparaciones entre estructuras cristalinas de algunos agonistas y antagonistas, y se ha postulado una hipótesis que explica las diferencias conformacionales entre estos, en función del enlace de hidrógeno que forma en 1-NH y la orientación de los grupos ésteres.

El PCA-50941 aumenta las contracciones de aorta de conejo inducidas por adición de Ca^{2+} en presencia de 10 mM de K^+ con la misma potencia que el Bay K 8644[5]. Sus efectos vasoconstrictores coronarios, muy débiles o incluso inexistentes, contrastan, por el contrario, con el potente efecto constrictor de coronaria que presenta el Bay K 8644[6]. El producto muestra una pronunciada selectividad vascular frente a la cardíaca, mientras el Bay K 8644 posee ambas acciones vasoconstrictoras e inotropopositivas de modo acusado. En este sentido, el PCA-50941 presenta ligeros efectos inotrópicos positivos en aurícula aislada de cobaya y efecto inotroponegativo en el corazón perfundido de rata.

Además, este compuesto mostró un perfil bifásico de vasoconstricción y varorrelajación, en aorta de conejo, mientras que el Bay K 8644 fue un agente vasoconstrictor puro.

Ambos compuestos, en corazón aislado de rata, disminuyeron el flujo coronario. En el caso del Bay K 8644, al causar un marcado aumento de la fuerza contráctil, el gasto cardíaco aumenta. Por el contrario, el PCA-50941 causa una disminución de la fuerza contráctil que conduce a un gasto cardíaco disminuido.

Los estudios hemodinámicos in vivo actualmente en curso confirman la potencial aplicación de este compuesto en situaciones clínicas tales como estados de shock, hipotensión idiopática crónica, migraña vascular, etc. Su selectividad tisular y su prolongada duración de acción otorgan al PCA-50941 un perfil cardiovascular más favorable que otros agonistas del calcio 1,4-dihidropiridínicos.

El último compuesto de tipo 1,4-aril-1,4-DHP desarrollado ha sido el PCA-50982[17] (fig. 4).

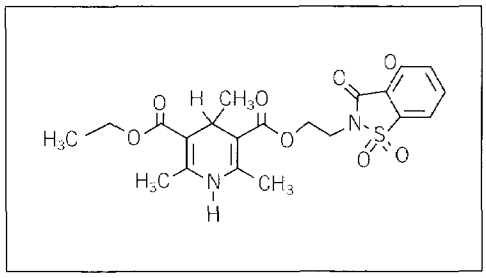

Fig. 5. Trombodipino.

Este compuesto posee la característica de que, además de incorporar un resto de benzisotiazolona en el éster en C3, posee una agrupación de 1,3-di-(N-morfolino) isopropilo. Esta modificación ha permitido obtener derivados dihidropiridínicos solubles en agua, mediante la formación de sus sales correspondientes, de forma similar a lo que sucede con el amlodipino.

La velocidad de instauración del efecto relajante del PCA-50982, en tiras helicoidades de aorta de conejo contraída con potasio, fue más lenta que la del amlodipino. La actividad desplazante del PCA-50982 de [^{3}H] isradipino en íleon de cobaya va aumentando linealmente con el tiempo de incubación. La cinética de instauración del efecto hipotensor de este compuesto resultó muy diferente de la del nifedipino. Mientras este último tiene un efecto temprano acusado, el PCA-50982 disminuye la presión arterial y la frecuencia cardíaca de forma lenta y paulatina, alcanzándose el efecto máximo tras una hora de administración del compuesto. En ratas espontáneamente hipertensas y conscientes no se aprecia aumento de la frecuencia cardíaca y el efecto hipotensor del PCA-50982 duró más de 18-20 h.

El PCA-50982 no produce aumento de la frecuencia cardíaca, e incluso presenta un ligero efecto bradicardizante. La instauración de la hipotensión lenta y gradual puede ser la principal causa de la ausencia de taquicardia refleja. A este efecto coadyuva otro adicional vasodilatador mixto (arterial y venoso) similar al de los nitratos, con mejora de la función cardíaca.

Este producto presenta la ventaja sobre otros de la misma familia de ser altamente soluble en agua, lo que lo hace especialmente indicado para su uso en venoclisis en unidades de cuidado intensivo y en accidentes cardiovasculares graves y agudos que incluyen isquemia cerebral, coronaria y crisis hipertensivas y anginosas.

4-alquil-1,4-dihidropiridinas con nuevas propiedades farmacológicas

Muchos grupos han descrito la actividad antiplaquetaria de 1,4-DHP usadas comúnmente como bloqueadores de los canales del calcio[18]. Sin embargo, la concentración usada en esta aplicación es de 2-3 órdenes de magnitud más altas que la necesaria para alcanzar los efectos sobre el sistema cardiovascular. Este hecho nos condujo a la idea de una nueva serie de 1,4-DHP con una mayor actividad antitrombótica y básicamente libre de efectos cardiovasculares. Así, se suprimió el sustituyente aromático del anillo de DHP, que es esencial para la acción como bloqueadores de los canales de calcio[9]. De esta forma, hemos introducido una resto alquilo, preferentemente metilo, en la posición 4 del anillo de 1,4-DHP. Simultáneamente, hemos unido un grupo de 2-benzisotiazolona-1,1-dióxido mediante un puente alquilénico al carboxilato en C-3[7]. De todos los compuestos sintetizados, fue seleccionado para su posterior desarrollo farmacológico y clínico el trombodipino, que aparece en la figura 5.

Este compuesto posee un perfil farmacológico muy diferente del de la aspirina y otros fármacos con actividad antiplaquetaria. El trombodipino posee un amplio espectro de actividad antiagregante, ya que es capaz de inhibir tanto la agregación como la reacción de liberación de las plaquetas estimuladas con los diversos agonistas fisiológicos[19]. Este compuesto es sólo un débil inhibidor de la agregación plaquetaria inducida por trombina o ácido araquidónico.

Cuando se administra por vía oral o intraperitoneal a dosis entre 0,1 y 10 mg/kg, el trombodipino ha demostrado poseer una potente actividad antitrombótica.

La administración a ratones de dosis únicas de compuesto indujo un alargamiento del tiempo de hemorragia de forma dependiente de la dosis desde la primera hora de su administración. Este efecto fue máximo a la dosis de 10 mg/kg.

El trombodipino protegió a los animales de experimentación de la muerte inducida por agonistas fisiológicos individuales y asociados entre sí, en un modelo de trombosis inducida por 2 agonistas que fue seleccionado por nuestro grupo por el hecho de que, a menudo, los episodios de trombosis son iniciados por más de un agonista[16,20,21].

Esta protección del trombodipino frente a la formación del trombo in vivo está relacionada con su efecto sobre la activación de las plaque-

tas, ya que el compuesto no modifica la adhesividad plaquetaria, responsable de la formación de la primera monocapa de plaquetas sobre la lesión vascular, ni actúa sobre los procesos de coagulación y fibrinólisis[22].

El mecanismo de acción del trombodipino es muy diferente del de los otros fármacos antiplaquetarios utilizados en la actualidad. Este compuesto no afecta a la producción de tromboxano A_2 como la aspirina[23], ni modifica la unión de fibrinógeno a su receptor en plaquetas, como en el caso de ticlopidina[24]. Se ha demostrado que trombodipino antagoniza selectivamente la entrada de calcio en plaquetas a través de canales operados por receptor, sin interferir con el mecanismo responsable de la movilización de calcio de los depósitos intracelulares[25]. Más recientemente, se ha sugerido que esta actividad del compuesto es específica para las plaquetas, ya que este efecto no se manifiesta en otras células tales como neutrófilos humanos o timocitos de rata[26].

Cuando se administraron dosis únicas de hasta 800 mg a voluntarios sanos, el trombodipino fue bien tolerado. Se apreció un alargamiento significativo del tiempo de hemorragia que, sin embargo, permaneció dentro del intervalo de valores normales e inhibición de la agregación de plaquetas inducida por distintos agonistas[27].

La administración de 200 mg/día de trombodipino durante 90 días a pacientes de enfermedad arterosclerótica incipiente, moderada o avanzada, produjo una marcada inhibición de la agregación plaquetaria inducida por colágeno, ADP y trombina, sin que se modificaran los parámetros de coagulación. Los resultados de la bioquímica de seguridad demostraron que el compuesto es perfectamente tolerado y posee un amplio margen de seguridad[28].

El PAF es un mediador fosfolipídico implicado en muchos procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se pueden mencionar el asma, la anafilaxia, alteraciones cardiovasculares y el shock séptico. El PAF actúa sobre las células a través de receptores específicos en la membrana celular.

Durante el cribado farmacológico de los compuestos que presentaban un resto de tioéter unido a través de un puente etilénico al carboxilato de la posición 3 del anillo de 1,4-DHP, se observó que inhibían la agregación plaquetaria inducida por PAF, pero no presentaban inhibición a la agregación inducida por otros agonistas tales como ADP, colágeno, trombina y ácido araquidónico[8].

De todos los compuestos obtenidos, se ha seleccionado el tiapafant, que aparece en la figura 6. Se trata de un derivado del núcleo de 1,4-dihidropiridina, carente de actividad sobre el sistema cardiovascular, que posee actividad antagonista del receptor del PAF[8].

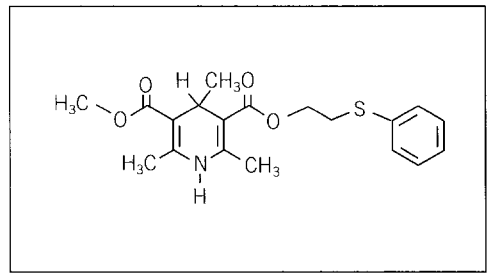

Fig. 6. Tiapafant.

El análisis de los datos obtenidos en experimentos de unión al receptor del PAF en plaquetas, neutrófilos y macrófagos alveolares de varias especies, incluyendo la humana, demostró que el tiapafant es un potente antagonista, específico y reversible de este receptor[29].

Cuando se administra por vía intravenosa u oral, en dosis de 0,1 a 2 mg/kg (DE_{50} = 0,45 mg/kg), el tiapafant es capaz de antagonizar el efecto hipotensor del PAF. En estos experimentos también se observó una inhibición del aumento de permeabilidad vascular mediado por PAF[30]. Este efecto protector se mantuvo cuando el tiapafant se administró a ratas que recibieron dosis letales y subletales de endotoxina bacteriana por vía intravenosa[31].

La administración a cobayas de tiapafant por vía intravenosa u oral bloquea de forma selectiva la broncoconstricción inducida por PAF, así como la trombocitopenia y leucopenia acompañantes. Además, este compuesto fue capaz de bloquear los efectos de la inyección de antígeno en pulmones de cobayas activamente sensibilizadas frente a dicho antígeno. Este efecto no ha podido ser demostrado para ninguno de los antagonistas del PAF conocidos hasta el momento[32], por lo que se ha sugerido que el tiapafant posee características originales en este tipo de situaciones patológicas[33].

Finalmente, se ha demostrado que el tiapafant es activo en una serie de modelos de inflamación y shock dependientes de PAF, endotoxina bacteriana, agregados de IgG y de IgE[34].

Los estudios clínicos de fase I en los que se han administrado de 10 a 640 mg de tiapafant a voluntarios sanos, han demostrado que el producto es bien tolerado y no posee efectos adversos[35].

BIBLIOGRAFÍA

1. Fleckenstein A. Die bedeutung der energiereichein phosphate für kontraktilitäk und tonus des myokards. Verh Dtsch Ges Inn Med 1964; 70: 81-99.
2. Janis RA, Silver PJ, Triggle DJ. Durg action and cellular calcium regulation. Adv Drug Res 1987; 16: 309-391.
3. Schramm M, Thomas G, Towart R, Franckowiak G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation calcium channels. Nature 1983; 303: 535-537.
4. Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Statkow P, Straumann D. U.S. Patent 4656181.
5. Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Santos L, García AG, Artalejo CR, Villarroya M et al. Synthesis of 3-[(2,3-Dihydro-1, 1,3-trioxo-1,2-benzisothiazol-2-yl)alkyl] 1,4-Dihydropyridine-3,5-dicarboxylate derivatives as calcium channel modulators. J Med Chem 1992; 35: 2.407-2.414.
6. Priego JG, González-Morales MA, Cillero FJ, Villarroya M, Sunkel C, Fau de Casa-Juana M et al. PCA-50941, a novel Ca^{2+} channel agonist. Eur J Pharmacol 1993; 243: 24-34.
7. Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Cillero FJ, Priego JG, Ortega MP. Synthesis, Plattelet aggregation inhibitory activity, and in vivo antithrombotic activity of new 1,4-dihydropyridines. J Med Chem 1988; 31: 1.886-1.890.
8. Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Santos L, Gómez MM, Villarroya M, González-Morales MA et al. 4-alkyl-1,4-dihydropyridines derivatives as specific PAF-acether antagonists J Med Chem 1990; 33: 3.205-3.210.
9. Loev B, Goodman MM, Snader KM, Tedeschi R, Macko E. «Hantzsch-type» dihydropyridinee hypotensive agents. J Med Chem 1974; 17: 956-965.
10. Statkow PR, Chatterjee SS, Straumann D, Sunkel C, Priego JG, Fau de Casa-Juana M. Furnidipine, a new selective and long-acting calcium entry blocking agent. XI Int Cong Pharmacol (Amsterdam) 1990; 173.
11. Alajarín R, Álvarez-Builla J, Vaquero JJ, Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Statkow PR et al. Synthesis and chromatographic separation of the steroisomers of furnidipine. Tetrahedron Assymetry 1993; 4: 617-620.
12. Priego JG, Florentino A, Sunkel C, Fau de Casa-Juana M, Statkow PR, Straumann D et al. Calcium antagonist activity of the different steroisomers of furnidipine [resumen]. 5th Int. Symp. Calcium antagonists: Pharmacol Clin Res (Houston) 1991; 31.
13. Goldmann S, Stotelfuss J, 1,4-Dihydropyridines: Effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. Angew Chem Int Ed Engl 1991; 30: 1.559-1.578.
14. Erne P, Burgisser E, Buhler FR, Dubach B, Kuhnis H, Meier M et al. Enhacementt of calcium influx in human platelets by CGP28392, a novel dihydropyridine. Biochem Biophys Res Comm 1984; 118: 842-847.
15. Takenaka T, Maeno H. A new vasoconstrictor 1,4-dihydropyridine derivative YC-170. Jpn J Pharmacol 1983; 32 (Supl): 139.
16. Di Minno G, Silver MJ. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. J Pharmacol Exp Ther 1985; 225: 57-60.
17. Fau de Casa-Juana M, Santos L, Sunkel C, Cillero J, García AG, González-Morales MA et al. Nuevos derivados de 1,4-dihydropiridina, procedimiento para su fabricación y uso como agentes terapéuticos. Patente Española N.º solicitud P-9302422/3.
18. Ono H, Kimura M. Effect of Ca^{2+}-antagonistic vadosilatadors. Diltiazem, Nifedipine and Verapamil on platelet aggregation in vitro. Arzneim-Forsch/Drugs Res 1981; 31: 1.131.
19. Ortega MP, Sunkel C, Priego JG. Inhibition of human platelet function by PCA-4230. Thromb Haemost 1987; 58: 632.
20. Ortega MP, Sunkel C, Priego JG. Protective effect of a new synthetic compound: PCA-4230, on several in vivo thrombosis models. Thromb Haemost 1987; 58: 631.
21. Ortega MP, Priego JG, Sunkel CE. Mouse antithrombotic assay: The effect of PCA-4230 versus Cilostazol. Thromb Haemost 1991; 65: 1.352.
22. Gutiérrez Díaz JA, Tolon RM, Sunkel C, Priego JG, Ortega MP. Interaction of platelets with subendothelium in rats treated with PCA-4230, a new antithrombotic agent. Haemostasis 1992; 22: 202-210.
23. Preston FE, Whipps S, Jackson CA, French AJ, Wyld PJ, Stoddard CJ. Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A_2 after low-dose aspirin. N Engl J Med 1981; 304: 76-79.
24. McTavish D, Faulds D, Goa KL. Ticlopidine. An update review of its pharmacology and therapeutic use in platelet-dependent disorders. Drugs 1990; 40: 238-259.
25. Alonso MT, Villalobos C, Sánchez A. Effects of the antithrombotic agent PCA-4230 on agonist-induced Ca^{2+} entry and Ca^{2+} release in human platelets. Biochim Biophys Acta 1992; 1.104: 257-260.
26. Montero M, Gómez MM, Ortega MP, Álvarez J. Inhibition of agonist-induced Ca^{2+} entry by the antithrombotic agent PCA-4230 is specific for platelets. Biochim Biophys Acta. En prensa.
27. Cillero J, Navarro JL, Narvaiza J, Priego JG, Sunkel CE, Ortega MP. Clinical pharmacology (Phase I) of PCA-4230, a new antithrombotic agent, in healthy volunteers. Thromb Haemost 1991; 65: 1.145.
28. Guivernau M. Resultados del ensayo clínico de Fase II en pacientes de enfermedad ateroesclerótica obliterante con PCA-4230. Informe Interno 1994.
29. Ortega MP, García MC, Gijón MA, Fau de Casa-Juana M, Priego JG, Sánchez-Crespo M et al. 1,4-Dihydropyridine, a new dass of platelet-activating factor receptor antagonist: In vitro pharmacologic studies. J Pharmacol Exp Ther 1990; 255: 28-33.
30. Fernández-Gallardo S, Ortega MP, Priego JG, Fau

de la Casa-Juana M, Sunkel C, Sánchez-Crespo M. Pharmacological actions of PCA-4248, a new platelet-activating factor receptor antagonist: in vivo studies. J Pharmac Exp Ther 1990; 255: 34-39.
31. Gómez MM, Sunkel C, Priego JG, Ortega MP. Activity of PCA-4248 in PAF or endotoxin-induced hypotension and death. J Lip Med 1990; 2: 211.
32. Pretolani M, Lefort J, Vargaftig BB. Limited interference of specific PAF-acether antagonists with hyperresponsiveness to PAF-acether itself of lungs from actively sensitized guinea-pigs. Br J Pharmacol 1989; 97: 433-439.
33. Lima MCR, Neto HCCF, Silva PMR, Dias MTRP, Bozza PT, Pérez SAC et al. Interference of PCA-4248, a novel PAF antagonist, on antigen-induced pleurisy. Eur J Pharmacol 1990; 183: 888.
34. Fernández-Gallardo S, Gijón MA, García C, Furió V, Liu F-T, Sánchez-Crespo M. The role of platelet-activating factor and peptidoleukotrienes in vascular changes of rat passive anaphylaxis. Br J Pharmacol 1992; 105: 119-125.
35. PCA-4248: A double blind, placebo-controlled rising single oral dose, safety, tolerance, pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy male volunteers. Hazleton-Besselaar, Internal report. 1994.

DISCUSIÓN

A. ALBILLOS: ¿Cuál es el sitio de unión de la molécula de dihidropiridina en el receptor?, ¿es el anillo piridina o depende de la conformación que adopta la molécula?

C. SUNKEL: Uno de los radicales más importantes es el NH en la posición 1 del anillo. Si cambia la conformación va cambiando la orientación de ese grupo NH, y ello tiene implicaciones en la unión de la molécula al receptor. Otra parte importante en la unión al receptor son los grupos carboxilatos, que como puede apreciarse en un modelo molecular, pueden adoptar dos orientaciones que modifican la conformación. Otro tipo de fijación son las uniones de tipo Van der Vaals, por ejemplo, del grupo aromático.

A. ALBILLOS: ¿Qué ocurre, por ejemplo, con amlodipino, que tiene un cloro en lugar de NO_2?

C. SUNKEL: Es un cloro derivado.

A. ALBILLOS: O sea, ¿que no tienen que haber necesariamente grupos NO_2 en la posición 2 y 3?

C. SUNKEL: No, por ejemplo, el amlodipino es un 2-cloro derivado, otros compuestos sintetizados en nuestro laboratorio, por ejemplo el PCA50938 es un 2-3 dicloro-derivado, y existen también trifluometilderivados. El mejor sustituyente es un grupo que atraiga electrones, no que los ceda como, por ejemplo, un grupo metilo. En este último caso no sería un antagonista del calcio potente.

M. HURLÉ: ¿El agonista PCA-50941 tiene acción bifásica como ocurre con algunos compuestos que son agonistas o antagonistas según las dosis?

A.G. GARCÍA: Creo que la mayoría de las dihidropiridinas son una mezcla racémica de agonista y antagonista. De hecho, se ha descrito que nifedipino, a dosis subnanomolares posee cierto efecto vasoconstrictor. En el caso de la molécula sintetizada por el Dr. Sunkel et al, posee la particularidad de que dependiendo del órgano se manifiesta más o menos el efecto agonista o antagonista.

C. MONTIEL: Cuando habla de las estructuras tridimensionales de las dihidropiridinas, ¿se refiere a la molécula en estado sólido, cristalino?, ¿qué ocurre cuando está en solución?

C. SUNKEL: Siempre que hablamos de conformación nos referimos al estado sólido. En solución, y teniendo en cuenta que los enlaces pueden rotar, la conformación va cambiando constantemente. El problema de la química médica para diseñar es que desconocemos lo que se llama conformación activa del compuesto; no sabemos cómo es la conformación activa en el momento que el compuesto se une al receptor y forma el complejo.

F. BARROS: Puesto que hay diferentes tipos de antagonistas orgánicos de canales de calcio ¿existe alguna estructura general en los canales que actúe como un sitio de unión al igual que podría ocurrir, por ejemplo, para las benzodiacepinas y ciertos receptores?

C. SUNKEL: No lo conozco.

A.G. GARCÍA: En cualquier caso, como reflexión final, deberíamos considerar la enorme plasticidad de las moléculas dihidropiridínicas, que poseen una variedad de acciones farmacológicas extraordinariamente amplia.

J. TAMARGO: Con respecto a los *pockets* para dihidropiridinas quisiera comentar que, si existen, deberían localizarse a nivel extracelular. Por otra parte, se supone que hay un *pocket* intracelular para el verapamilo y que hasta hace poco pensábamos que era para el diltiazem. Los datos más recientes apuntan que los derivados del diltiazem también tendrían un *pocket* extracelular.

J. LÓPEZ BARNEO: Usted ha comentado la diferencia de afinidad de los 4 esteroisómeros en el cerebro, pero había un grupo que tenía un alto nivel de unión del furnidipino y otro grupo que se unía con menos afinidad, ¿ha observado esa diferencia de los mismos esteroisómeros en otros tejidos que no sean el cerebro?

C. SUNKEL: En cerebro y corazón. Se ha comprobado que la configuración que importa para la actividad de estos compuestos que tienen dos centros de simetría, es la configuración del carbono 4 del anillo de 1-4 de dihidropiridina. Y tanto en el corazón como en el cerebro siempre es la configuración S la que muestra mayor afinidad por el receptor.

La señal celular del calcio: implicaciones fisiológicas y farmacoterápicas

A.G. García, A. Albillos, L. Gandía, B. Lara, M.G. López y M. Villarroya

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción

De la lectura de los anteriores artículos de Gandía et al y García-Sancho se desprende la importancia del catión calcio (Ca^{2+}) como mensajero ubicuo que participa en múltiples procesos biorreguladores. Así pues, la elevación de las concentraciones citosólicas de Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, tras la activación de canales de Ca^{2+} plasmalemales o intracelulares, constituye una señal celular que activa distintos procesos fisiológicos (fig. 1). El objetivo de este artículo es resaltar el significado fisiológico de esa señal celular y su relevancia para el desarrollo de nuevos fármacos calciomoduladores. Ilustraremos estas facetas con un ejemplo en el que poseemos experiencia directa, la secreción de neurotransmisores. Finalmente, haremos algunas consideraciones sobre las posibilidades de desarrollar nuevos fármacos que modulen la actividad de distintos subtipos de canales de Ca^{2+} neuronales.

Gradientes de calcio y secreción

Para esclarecer la forma en que se modulan los fenómenos de neurosecreción por cambios transitorios de la $[Ca^{2+}]_i$, se han seguido dos estrategias fundamentales. Por una parte, se ha demostrado que puede inducirse secreción de catecolaminas por $[Ca^{2+}]_i$ relativamente bajas, en el orden de 1 μM, en células cromafines bovinas permeabilizadas[1]. Igualmente, la estimulación de células intactas produce cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en torno al μM durante la activación del proceso secretor[2-4]. Por otra parte, se han hecho predicciones teóricas sobre los cambios espaciotemporales de la $[Ca^{2+}]_i$, que tendrían lugar en microdominios citosólicos, en el subplasmalema en donde tiene lugar la exocitosis. Se ha calculado que durante la despolarización celular, la $[Ca^{2+}]_i$ puede incrementarse desde el nivel basal de 0,1 μM hasta 10-100 μM[5-7]. Estas concentraciones son considerablemente mayores que las que se detectan al medir los cambios globales promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ en una célula cargada con fura-2.

Una explicación plausible para estas opiniones divergentes sería la propuesta de que desde la óptica cuantitativa, la secreción producida a altas y bajas $[Ca^{2+}]_i$ podría ser similar. Sin embargo, la velocidad inicial de la secreción se aceleraría de manera considerable por $[Ca^{2+}]_i$ elevadas[8]. De tener lugar sólo en ciertos microdominios celulares, estas concentraciones tan elevadas no podrían detectarse con las técnicas utilizadas para la medición promedio de los cambios de $[Ca^{2+}]_i$ con fura-2, debido a su baja resolución espaciotemporal. Por tanto, es factible que las células que producen una secreción rápida en respuesta a estímulos fisiológicos, tipo neuronas[9] células cromafines[10] o células de la hipófisis anterior[11], puedan hacerlo porque las $[Ca^{2+}]_i$ que se alcanzan en dominios exocitóticos son sustancialmente más elevadas que las que se han utilizado en células permeabilizadas.

Augustine y Neher[12] estudiaron la Ca^{2+}-dependencia de la secreción en células cromafines individuales, midiendo simultáneamente la capacitancia eléctrica de la célula como índice de exocitosis, y la $[Ca^{2+}]_i$ con fura-2. Encontraron que la diálisis intracelular de Ca^{2+} con una pipeta de *patch-clamp* disparaba la secreción. La secreción se incrementó cuando las $[Ca^{2+}]_i$

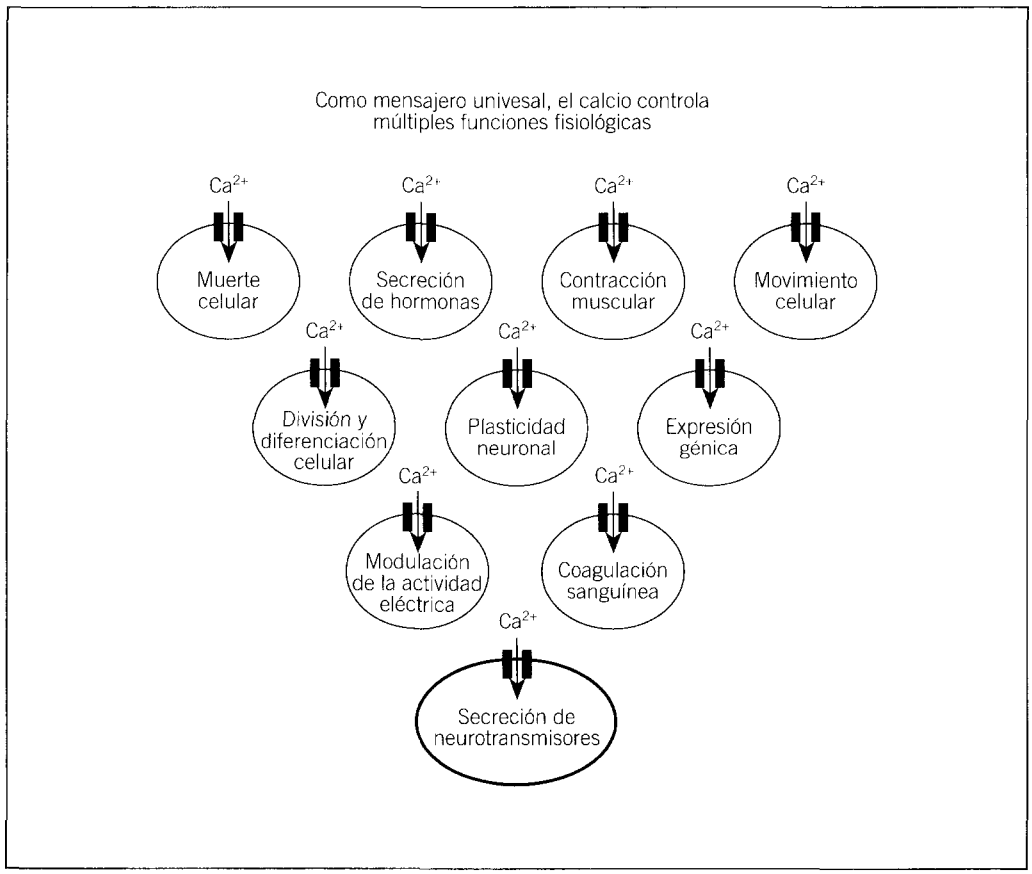

Fig. 1. Multiplicidad de funciones biológicas controladas por señales desencadenadas por incrementos transitorios de la concentración citosólica del catión Ca^{2+}. En el vértice de la pirámide destaca la secreción de neurotransmisores porque es la función fisiológica elegida para ilustrar la temática de este artículo.

eran mayores de 0,2 μM y se saturaba a concentraciones mayores de 10 μM. La secreción tenía un coeficiente de Hill para la $[Ca^{2+}]_i$ de 2. La aplicación de pulsos despolarizantes breves produjo incrementos transitorios tanto de la $[Ca^{2+}]_i$ como de la secreción. La comparación de las velocidades de secreción durante estas despolarizaciones, con las producidas por la diálisis de Ca^{2+}, sugiere que, durante la despolarización celular, la $[Ca^{2+}]_i$ que se alcanza en dominios subplasmalemales de secreción puede ser mayor de 10 μM. La medición promedio de la $[Ca^{2+}]_i$ en células intactas indica cambios mucho menores. Por ello, cabe concluir que durante la despolarización, deben producirse gradientes espaciales muy acusados de la $[Ca^{2+}]_i$.

Para el estudio de gradientes de Ca^{2+} y secreción en células cromafines bovinas, utilizamos en nuestro laboratorio una estrategia diferente[13]. Se midieron los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción de catecolaminas en células estimuladas con una solución despolarizante (100 mM de K^+). Una vez despolarizadas, se ofreció a las células Ca^{2+} o Ba^{2+} en forma de escalón brusco, o en forma de rampa lineal que permitía el incremento gradual de la concentración extracelular de cada catión, desde 0 a 2,5 mM, en un período de 10 min (fig. 2). Observamos una clara separación entre los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y el curso temporal de la respuesta secretora. Con el escalón de Ca^{2+} se apreció un incremento paralelo de la $[Ca^{2+}]_i$ y la secreción, que alcanzó un pico en pocos se-

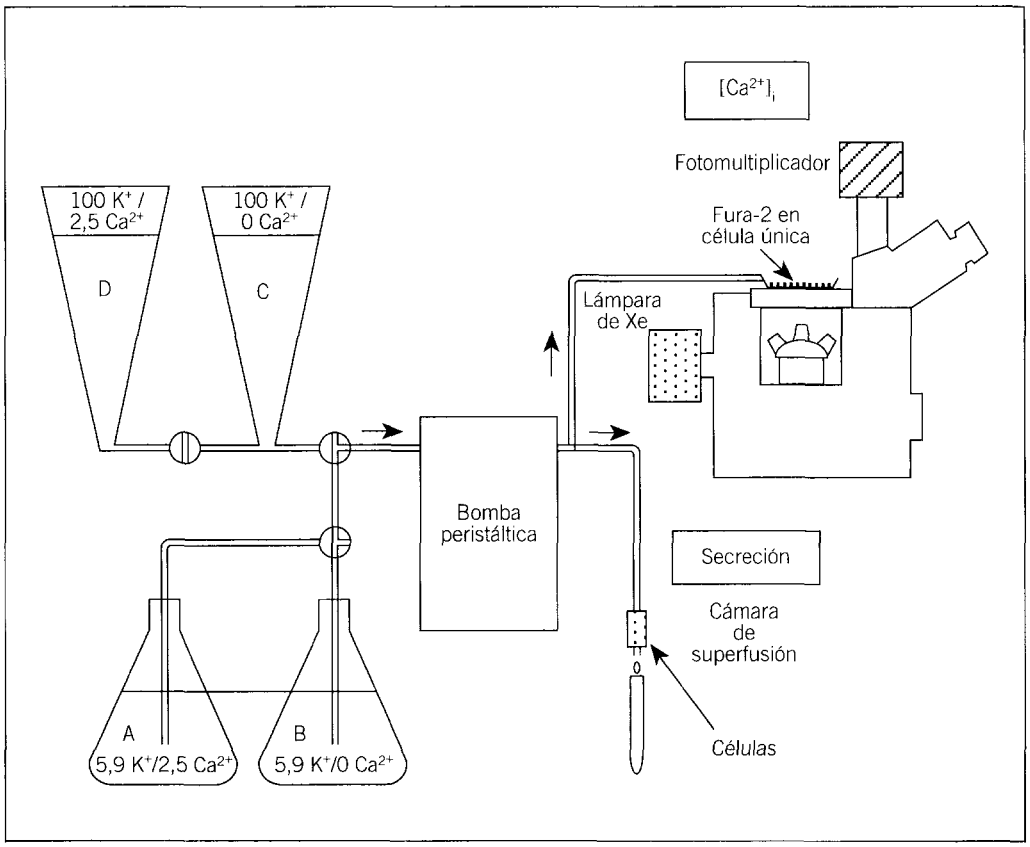

Fig. 2. Dispositivo utilizado para el estudio de gradientes de cationes divalentes Ca^{2+} y Ba^{2+}, y su influencia sobre el proceso de secreción de catecolaminas en células cromafines aisladas de médula suprarrenal bovina, y mantenidas en cultivos primarios. Los recipientes D y C son los utilizados normalmente para preparar gradientes continuos de sacarosa para la preparación de partículas subcelulares por centrifugación diferencial. La secreción de catecolaminas se controla, continuamente, mediante un detector electroquímico al que se dirige el líquido que superfunde las células cromafines. También pueden colectarse muestras y las catecolaminas presentes en las mismas se analizan fluorométricamente. Los incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ se miden con un equipo de microfluorometría adaptado a un microscopio invertido, en una sola célula de cromafín cargada con la sonda fluorescente fura-2. En este mismo equipo hemos adaptado recientemente los elementos necesarios para medir, simultáneamente en la misma célula, corrientes de Ca^{2+}, cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y secreción de catecolaminas. Adaptado de Michelena P et al[13].

gundos. El paralelismo se perdió después de pocos minutos, ya que la secreción volvió a valores basales pero la $[Ca^{2+}]_i$ permaneció elevada en una meseta de 0,4 μM. Con la rampa de Ca^{2+} tan sólo observamos un pequeño pico transitorio de secreción, a pesar de que la $[Ca^{2+}]_i$ permaneció elevada durante todo el período de 10 min de estimulación. Esta separación entre $[Ca^{2+}]_i$ y secreción se apreció también en condiciones experimentales en las que era factible que los canales de Ca^{2+} L permanecieran abiertos, ya que se utilizó una ligera despolarización (18 mM de K^+) y el activador de esos canales, Bay K 8644 (1 μM). En otras palabras, la secreción fue, de nuevo, transitoria pero la $[Ca^{2+}]_i$ permaneció elevada en una meseta. Si en vez de Ca^{2+} se aplican escalones o rampas de Ba^{2+}, se obtienen respuestas secretoras no inactivantes. Estos resultados sugieren que la velocidad y la cuantía de la secreción no

son una función simple de la $[Ca^{2+}]_i$ que se alcanza en un momento dado, y son compatibles con las siguientes conclusiones: *1)* la velocidad de secreción depende de la existencia de un gradiente de Ca^{2+} muy acusado, que permita alcanzar $[Ca^{2-}]_i$ muy elevadas (10-100 μM) en los microdomios citosólicos en los que acontece la exocitosis probablemente ubicados cerca de la boca interna de los canales de Ca^{2+} L, y *2)* la inactivación $[Ca^{2+}]_i$-dependiente de los canales de Ca^{2+} contribuye a disipar ese gradiente de Ca^{2-} y a regular la secreción[14].

Otro importante factor que puede contribuir a modular la secreción a medio y largo plazo es el de la existencia de varios depósitos de vesículas secretoras, uno de vesículas fácilmente liberables, ancladas en el plasmalema, y otro de reserva. Este esquema surgió de las observaciones siguientes. La velocidad de secreción con la diálisis de Ca^{2+} a través de una pipeta de *patch* es considerablemente menor, para una determinada $[Ca^{2+}]_i$, que la observada en respuesta a despolarizaciones breves (Ca^{2+} extracelular que penetra en la célula por canales de Ca^{2+})[12]. Por otra parte, la cantidad total de secreción es siempre mucho mayor con la diálisis de Ca^{2+} que con la elevación rápida de la $[Ca^{2+}]_i$ por despolarización. Neher y Zücker[15] utilizaron DM-nitrofeno (un compuesto que une Ca^{2+} y lo libera rápidamente por fotólisis) para investigar la cinética de la secreción Ca^{2+}-dependiente en células cromafines bovinas. La fotólisis produjo la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ en escalones de 100 μM, que indujeron una secreción intensa de varios segundos de duración, seguida de una lenta y persistente secreción. Los distintos componentes de esta cinética pueden representar la existencia de depósitos vesiculares con mayor o menor disponibilidad para secretar. Tanto el transporte de vesículas, desde el depósito de reserva hasta el liberable, como la propia secreción parecen ser fenómenos Ca^{2+}-dependientes. En base a ello, Heinemann et al[16] han propuesto un modelo de secreción que consta de dos fases. El modelo contempla la existencia de una depresión o un aumento de la secreción en ciertas condiciones experimentales. Así, después de la aplicación de estímulos intensos, el depósito liberable disminuye, lo que ocasiona una depresión de la respuesta secretora cuando se estimula, posteriormente, la célula. La recuperación de la secreción se acelera cuando se incrementa moderadamente la $[Ca^{2-}]_i$; ello se debe, probablemente, a la recuperación del depósito liberable. Con esta manipulación, el depósito puede rellenarse de más, por lo que las respuestas secretoras subsiguientes pueden estar incrementadas[17].

Canales de calcio y neurosecreción

Conocer cuál es la participación de cada subtipo de canal de Ca^{2+} (L, N, P, Q) en la regulación de la liberación de distintos neurotransmisores en distintas sinapsis, saber su grado de acoplamiento con la maquinaria secretora, así como su distribución geográfica y su aportación individual a los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ en microdominios neuronales constituye, ahora mismo, uno de los temas de investigación más candentes en neurociencia.

Ante esta creciente diversidad de canales de Ca^{2+}, cabe plantearse cuál es la función de cada uno de estos subtipos y/o qué subtipo de canal regula la liberación de un determinado neurotransmisor en las sinapsis centrales y periféricas. En el SNC, se ha demostrado que la ω-conotoxina GVIA (GVIA), un bloqueador selectivo de canales N, inhibe potentemente, aunque parcialmente, la liberación de glutamato[18,19], de acetilcolina[20], de dopamina[19,21] y de noradrenalina[22]. Otros estudios muestran un papel predominante de los canales no N no L en la liberación de neurotransmisores en sinapsis centrales[23]. Por otro lado, en sinapsis periféricas, parece que es el canal tipo N el que regula predominantemente la liberación de neurotransmisores. Así, en neuronas simpáticas de rata, Hirning et al[24] encontraron que la GVIA era capaz de bloquear la liberación de noradrenalina. Un bloqueo similar por GVIA en sinapsis noradrenérgicas periféricas ha sido descrito por Clasbrummel et al[25] y Feuerstein et al[26]. Más recientemente, Wheeler et al[27] han descrito que tanto los canales de Ca^{2+} tipo N como los Q regulan la transmisión sináptica en el hipocampo.

La regulación del proceso secretor de catecolaminas por un determinado subtipo de canal de Ca^{2+} parece ser algo más complejo. Como describen Gandía et al en un artículo anterior, la presencia en células cromafines de los diferentes subtipos de canales varía en función de la especie estudiada. En la célula cromafín de gato hemos identificado canales tipo L y N en proporciones similares. Sin embargo, el proceso secretor de catecolaminas puede bloquearse totalmente sólo por dihidropiridinas (DHPs) antagonistas, y muy poco por GVIA[28]. En la célula cromafín bovina, el patrón observado parece ser mucho más complejo. Los canales tipo L suponen tan sólo un 15-20% cuan-

do se estudian las corrientes globales de Ba^{2+}; sin embargo, el bloqueo de la secreción por DHP es de un 50%. Si bien estos datos apoyan la idea de que este subtipo de canal estaría muy directamente relacionado con el proceso de exocitosis, también nos indican la existencia de otro componente que es capaz de controlar, aproximadamente, otro 50% del proceso exocitótico. Este 50% no se bloquea por la combinación de GVIA y ω-agatoxina IVA (IVA), un bloqueador de canales P, a pesar de que estos eran los componentes mayoritarios en los estudios electrofisiológicos. Recientemente, con la disponibilidad de una nueva toxina, la ω-conotoxina MVIIC (MVIIC), hemos conseguido bloquear de una forma contundente el proceso secretor de catecolaminas en células cromafines bovinas, mediante la combinación de esta toxina y DHP. Estos datos funcionales parecen sugerir la existencia de un nuevo subtipo de canal de Ca^{2+}, denominado Q, en la membrana de la célula cromafín bovina, dato que parece confirmarse por estudios electrofisiológicos[29].

Localización de canales de calcio en microdominios del plasmalema: importancia para la regulación de la neurosecreción

Existen varios trabajos que sugieren que la liberación de neurotransmisores no ocurre al azar en toda la superficie del plasmalema. Por ejemplo, Schroeder et al[30] han utilizado delicados electrodos de fibra de carbono, cuya punta se pule al fuego hasta que alcanza 1 μm de diámetro. Cuando se acerca este electrodo a una célula cromafín, y esta se estimula con agentes despolarizantes, el electrodo detecta la secreción de catecolaminas mediante técnicas amperométricas[17]. Moviendo el microelectrodo por distintas áreas de la superficie celular, se han identificado microdominios en los que no se produce exocitosis, junto a otros en que sí acontece (zonas activas). Por otra parte, Augustine y Neher[12] llegaron a la conclusión de que la $[Ca^{2+}]_i$ subplasmalemal, durante la despolarización celular, podría alcanzar valores de decenas de μmol. Para generar esta señal de Ca^{2+} tan drástica y versátil, se impone el esbozo de una nueva hipótesis. Para poder elevar la $[Ca^{2+}]_i$ así, los canales de Ca^{2+} deberían apiñarse cerca de las zonas activas exocitóticas. Es decir, los canales de Ca^{2+} que suministran el Ca^{2+} necesario para disparar rápidamente la secreción formarían una unidad morfofuncional con las estructuras de la maquinaria secretora, muy cerca de aquellos lugares en los que las vesículas se acumulan y se anclan al plasmalema, preparándose para vaciar su contenido al espacio extracelular tan pronto como un potencial de acción active dichos canales. Llinás et al[31] han proporcionado evidencias en favor de esta hipótesis en la sinapsis gigante del calamar. La tecnología disponible hasta el momento sólo permite el uso de este modelo sináptico para detectar, con suficiente resolución espaciotemporal, los rápidos cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ que se producen en microdominios cercanos al axolema durante un potencial de acción. Para ello, utilizaron una fotoproteína (n-aequorina-J) que, al poseer baja afinidad por el Ca^{2+}, puede detectar cambios de decenas de μmol en la concentración citosólica del catión. Con esta precisa estrategia demostraron la existencia de transientes de $[Ca^{2+}]_i$ en puntos específicos de la terminación presináptica del axón gigante del calamar.

La célula cromafín es demasiado pequeña para lograr una resolución espacial suficiente y apreciar microdominios de transientes de $[Ca^{2+}]_i$. Sin embargo, tiene la ventaja de que posee varios subtipos de canales de Ca^{2+} (véase el artículo de Gandía et al en esta monografía) y de que su respuesta secretora es fácilmente cuantificable con técnicas flurométricas clásicas, o con las más modernas de amperometría. Por ello, hemos estudiado en este modelo la vinculación que cada canal de Ca^{2+} posee con la maquinaria secretora y planteado la hipótesis de que determinados subtipos de canales de Ca^{2+} se encuentren más cercanos que otros al dispositivo secretor.

En células cromafines de gato, el análisis cinético y farmacológico de corrientes globales de Ca^{2+} y Ba^{2+} reveló la presencia mayoritaria de canales de Ca^{2+} N y L[32]. Por otra parte, sabemos desde hace una década que la secreción de catecolaminas en células cromafines felinas es extremadamente sensible a concentraciones nanomolares de activadores y bloqueadores DHP de canales L[33]. Este hecho nos llevó a preguntarnos por la razón de la existencia en la célula cromafín de gato de canales N y L, y cuál sería su participación relativa en el control de la secreción. El pico de corriente global de Ca^{2+} se inhibió un 47% por la DHP furnidipino, y la corriente tardía un 80%. La GVIA redujo el pico de corriente un 42% y un 55% la fase tardía. En lo que se refiere a la señal citosólica del Ca^{2+}, producida por pulsos breves de K^+ elevado aplicados a células cromafines felinas cargadas con fura-2, esta se redujo un

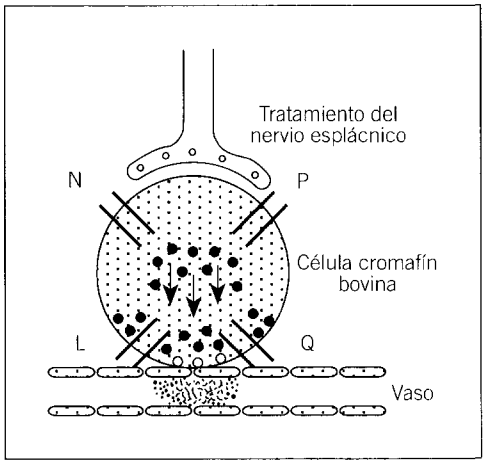

Fig. 3. Esquema de la sinapsis colinocromafín en la médula de la glándula suprarrenal intacta. Modelo que propone la distinta localización geográfica de los distintos subtipos de canales de Ca^{2+} para explicar el bloqueo selectivo de la secreción de catecolaminas a la circulación, por agentes que afectan canales de Ca^{2+} voltajedependientes L o Q, pero no los P o N. Los canales alejados de la maquinaria secretora pueden surtir de Ca^{2+} y la célula para regular otras funciones distintas a la de exocitosis, y que requieren concentraciones más bajas del catión. Por ejemplo, el transporte de vesículas desde el aparato de Golgi hasta el depósito liberable, situado adyacente al plasmalema, la activación de enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas mediante fosforilaciones Ca^{2+}-dependientes, o la expresión génica.

44% por furnidipino y un 42% por GVIA. La secreción de catecolaminas, sin embargo, se afectó de manera diferente por ambos bloqueadores. Mientras que el furnidipino bloqueó más de un 95% la respuesta secretora al K^+ elevado, la GVIA la redujo apenas un 20%. Así pues, los canales L y N parecen aportar cantidades similares de Ca^{2+} al interior celular. Pero el Ca^{2+} que ve el citosol parece que tiene «diferentes colores». Uno sirve para secretar (canales L), pero el otro no (canales N). Esta observación nos llevó a plantear la hipótesis de que los canales de Ca^{2+} del subtipo L tendrían que ubicarse en la inmediata vecindad de los sitios activos de exocitosis en el plasmalema[28,34].

Durante los últimos meses hemos sometido esta hipótesis a una cuidadosa evaluación en otro modelo de célula cromafín, el bovino, cuya dotación de canales de Ca^{2+} parece más heterogénea que la felina. De hecho, en la célula cromafín bovina hemos disecado al menos cuatro subcomponentes en sus corrientes globales de Ca^{2+}, a saber, uno sensible a furnidipino (canal L), otro a GVIA (canal N), un tercero a IVA (canal P) y un último componente sensible a MVIIC (canal Q)[29]. Con anterioridad a estos experimentos, habíamos observado que la secreción de catecolaminas en la adrenal intacta bovina era insensible a GVIA, y sólo parcialmente sensible a DHP[35,36]. Más tarde, demostramos que la corriente de Ca^{2+} poseía un componente sensible a IVA, y sugerimos que los canales P colaborarían con los L en el control de la secreción cromafín bovina[37,38]. Pero hace unos meses observamos que la secreción cromafín bovina era insensible a IVA[29]. La reciente disponibilidad de MVIIC nos ha permitido encontrar el eslabón perdido en esa compleja cadena de múltiples canales de Ca^{2+} y secreción. El furnidipino por un lado y la MVIIC por otro reducen a la mitad la secreción y la combinación de los dos la abole. Así pues, la célula cromafín bovina en cultivos primarios expresa cuatro subtipos de canales de Ca^{2+} (L, N, P, Q), pero sólo dos, los L y los Q, parecen estar estrechamente vinculados a la regulación de la exocitosis.

Nuestros resultados chocan parcialmente con otros presentados en un estudio reciente, en los que se midió, simultáneamente, en una única célula cromafín, la corriente global de Ca^{2+} y la secreción, esta mediante la capacitancia eléctrica de la membrana[39]. En este estudio se concluye que la corriente global de Ca^{2+} en la célula cromafín bovina consta sólo de 3 componentes, L, N y P. Se asevera que los 3 canales contribuyen al control de la secreción, pero los L poseen un peso específico considerablemente mayor. Para explicar esta discrepancia podrían esgrimirse diferencias metodológicas en el cultivo de las células, en diseños experimentales o en la técnica utilizada para medir la secreción. Artalejo et al[39] utilizaron técnicas de *patch-clamp* y capacitancia para medir corrientes de Ca^{2+} y secreción, respectivamente. Nosotros utilizamos técnicas de *patch-clamp* para medir corrientes, amperometría y fluorescencia para cuantificar secreción y, además, cuantificamos la captación de $^{45}Ca^{2+}$ y medimos los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$. Por lo demás, las neurotoxinas que utilizamos son las mismas. Por tanto, el hecho de que nosotros adscribamos al control de la secreción a canales Q y L y Artalejo et al[39] a canales L, N y P constituye una discrepancia tan drástica que es difícil de reconci-

liar aduciendo, tan sólo, diferencias metodológicas.

Una hipótesis y un modelo

En la suprarrenal intacta, las células cromafines de su médula liberan, directamente a la circulación, sus catecolaminas adrenalina y noradrenalina. Para que nuestro organismo responda adecuadamente con reacciones de alerta, lucha o huida ante una determinada situación de estrés o peligro, la secreción de catecolaminas debe ser rápida, contundente y precisa. Es lógico, pues, que los sitios activos de secreción se localicen preferentemente en la zona del plasmalema que mira a la luz vascular (fig. 3). Esta especialización geográfica de la secreción sugiere que los canales de Ca^{2+} de los subtipos Q y L deben colocalizarse con los sitios activos exocitóticos, en la superficie celular que mira a los vasos. De esta manera, cuando el nervio esplácnico activa la célula cromafín mediante la secreción de acetilcolina, esta genera potenciales de acción que selecionan, seguramente, los 4 canales de Ca^{2+}. Pero sólo el Ca^{2+} que entra por los L y los Q es capaz, por su localización estratégica, de generar una rápida y transitoria elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ de varias decenas de μmol. Esta es una señal, pues, altamente localizada en un microdominio de la célula cromafín, cercano al plasmalema de la superficie secretora, allí en donde las vesículas permanecen ancladas a la membrana, dispuestas para expeler su contenido catecolaminérgico a la circulación en unos pocos ms.

Como comentamos al principio, el Ca^{2+} regula multitud de procesos biológicos. Una célula como la cromafín debe asegurar una secreción continuada de catecolaminas en situaciones de estrés prolongados. El transporte de nuevas vesículas para reponer las ya utilizadas, la síntesis de catecolaminas mediante enzimas que requieren para su activación una fosforilación, o la expresión de los genes que dirigen la síntesis de estos u otras enzimas son todos fenómenos Ca^{2+}-dependientes. Sin embargo, los valores de $[Ca^{2+}]_i$ que requieren son sustancialmente menores, y tampoco precisan cambios o gradientes tan bruscos como los que necesita la maquinaria secretora para funcionar con extremada rapidez. Es plausible que esos incrementos de la $[Ca^{2+}]_i$ en microdominios de la maquinaria secretora se produzcan por vía de los canales N y P que, en la célula cromafín bovina, estarían ubicados en las zonas del plasmalema en las que la exocitosis no tiene lugar.

Implicaciones farmacoterápicas

La sobrecarga de las células con un exceso de Ca^{2+} es un mecanismo citotóxico que puede causar su muerte. De hecho, se acepta que la excesiva entrada de Ca^{2+} constituye un mecanismo patogénico crucial en varias enfermedades del aparato cardiovascular y del sistema nervioso central, por ejemplo, la hipertensión, la enfermedad isquémica coronaria, el infarto de miocardio o el ictus. La acumulación excesiva de Ca^{2+} en neuronas se ha asociado también a enfermedades neurodegenerativas de evolución crónica del tipo enfermedad de Alzheimer o de Parkinson. El Ca^{2+} parece desempeñar también un importante papel en patologías del tipo de la epilepsia, que cursan con una hiperexcitabilidad neuronal. Dada esta rica patología, no es extraño que la mayoría de los esfuerzos para la búsqueda y desarrollo de fármacos que interfieren con la homeostasis celular del Ca^{2+} se hayan canalizado hacia la prevención de la entrada y la sobrecarga celular de Ca^{2+}.

Los denominados actualmente antagonistas del calcio[40], bloqueadores de la entrada de Ca^{2+}, o bloqueadores de canales de Ca^{2+} inhiben selectivamente los canales del subtipo L. Constituyen un grupo heterogéneo de moléculas con gran relevancia en el tratamiento de enfermedades del aparato cardiovascular. Aparte de sus ya clásicas indicaciones en el tratamiento de la hipertensión y de la isquemia coronaria, se está en este momento resaltando su actividad citoprotectora por prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} en situaciones de isquemia tisular. Tanto a nivel preclínico como clínico existen numerosos datos que apoyan esta actividad. Son los siguientes: *1)* a nivel cardíaco, el verapamilo y el diltiazem, pero no el nifedipino, disminuyen la incidencia de reinfartos y la mortalidad en pacientes con infarto agudo de miocardio[41-43]; *2)* a nivel cerebral, el nimodipino previene las secuelas neurológicas tras una hemorragia subaracnoidea, y la flunarizina posee claros efectos antimigrañosos; *3)* algunas dihidropiridinas (nifedipino, lacidipino, isradipino), el verapamilo y el diltiazem poseen potencial antiaterogénico, y *4)* el verapamilo, el diltiazem y el nitrendipino protegen frente a la toxicidad renal producida por radiocontrastes; además, el verapamilo protege frente a la nefrotoxicidad inducida por ciclosporina[44].

En la actualidad se están investigando muchos nuevos bloqueadores de canales L, y también algunos activadores. Se persigue encontrar una mayor selectividad tisular y un mejor perfil farmacocinético. Especialmente relevantes son la citoprotección y el potencial antiaterogénico, así como sus posibles aplicaciones no cardiovasculares (p. ej., enfermedades del tipo del colon irritable, con alteraciones secretoras y motoras del tracto gastrointestinal).

La farmacología de los canales de Ca^{2+} no L está por descubrir. Tan sólo disponemos de neurotoxinas, que se han utilizado recientemente en modelos de isquemia cerebral para conocer sus posibles efectos neuroprotectores[45]. Por ejemplo, con una única inyección en bolo de ω-conotoxina MVIIA (MVIIA), un inhibidor reversible de los canales de Ca^{2+} N, se produce una neuroprotección significativa cuando el péptido se administra 24 h antes de la agresión isquémica. La toxina protegió las neuronas piramidales de área CA1 del hipocampo de rata, frente al daño producido por una isquemia cerebral global. Sin embargo, la MVIIC, que bloquea canales Q con mayor afinidad que los N y P, no produjo neuroprotección. La MVIIC sí fue eficaz para reducir el volumen de infarto neocortical en modelos de isquemia focal de cerebro de rata. La toxina es eficaz tanto si se administra durante la oclusión como tras el episodio isquémico, lo que sugiere que la ventana terapéutica para instaurar un tratamiento postictus puede ser mayor de lo que se pensaba. Estos datos, aunque aún son preliminares y escasos, sugieren que los conopéptidos y sus derivados pueden ser útiles en la profilaxis del daño neuronal secundario a un accidente isquémico por ictus, parada cardíaca, trauma craneal o trauma de la médula espinal.

Los bloqueadores de canales N podrían también ser eficaces en otros síndromes específicos del sistema nervioso central. Por ejemplo, la administración intratecal de MVIIA abole la respuesta nociceptiva observada con el test de formalina en la pata trasera de la rata. Por otra parte, la alodinia tactil se suprimió selectivamente en un modelo de dolor neuropático tras la administración intratecal de MVIIA; este efecto fue 100 veces más potente que el de morfina.

Perspectivas farmacoterápicas

El uso clínico de péptidos que bloqueen canales de Ca^{2+} neuronales está condicionado por su limitada difusión (no atraviesan la barrera hematoencefálica) y su rápida degradación por vía oral. Por tanto, los esfuerzos deben dirigirse a la síntesis de moléculas no peptídicas que bloqueen uno u otro subtipo de canal de Ca^{2+}. Una de las estrategias que se están siguiendo consiste en esclarecer la estructura molecular de neurotoxinas conocidas. Así, esclarecer la estructura tridimensional de conotoxinas y agatoxinas constituye el primer paso para la comprensión de los determinantes moleculares que les confieren selectividad para unirse a un determinado canal. Con esta idea, hemos definido recientemente la estructura tridimensional de la GVIA, mediante el uso de técnicas de resonancia magnética nuclear de protones[46]. La estructura es globular; la molécula en solución se dobla y estabiliza mediante 3 puentes disulfuro y varios enlaces de hidrógeno intramoleculares. En la periferia se encuentran 14 grupos hidroxilo, completamente expuestos al solvente. Estos grupos, más las cadenas laterales de lisina y arginina con residuos polares, que emergen radialmente del núcleo peptídico, proporcionan elementos específicos de reconocimiento para la interacción de la toxina con el canal neuronal N. En la actualidad, en colaboración con J Álvarez-Builla (Universidad de Alcalá de Henares), estamos intentando sintetizar moléculas no peptídicas basándonos en los farmacóforos de la GVIA, que pudieran bloquear selectivamente los canales de Ca^{2+} del subtipo N.

Otra importante pregunta por contestar se relaciona con la definición del número de canales de Ca^{2+} que controlan la liberación de neurotransmisores. Se han identificado ya muchos subtipos de receptores para varios neurotransmisores (cinco para dopamina, 12 para serotonina). Es plausible, pues, que la liberación de un neurotransmisor pudiera controlarse por subtipos de canales de Ca^{2+} diferentes, de acuerdo con el tipo de receptor presente en una determinada sinapsis.

Finalmente, cabe preguntarse hasta dónde vamos a llegar con esta creciente diversidad de canales de Ca^{2+} y cuál es la función específica de cada subtipo de canal. En cualquier caso, esta enorme complejidad tiene un lado positivo, y es la diversidad de dianas para buscar fármacos cada vez más selectivos que modulen uno u otro subtipo de canal de Ca^{2+}.

Resumen

Dada la diversidad de funciones fisiológicas que controla el catión Ca^{2+}, no debe soprendernos el creciente número de subtipos de ca-

nales de Ca^{2+} voltajedependientes (L, N, P, Q, T) que se están identificando y caracterizando. No es difícil entender que un canal L controle la contractilidad miocárdica, uno, T, el marcapasos de una neurona y otro, N, la liberación de noradrenalina en neuronas simpáticas. Sin embargo, cuando como en el caso de la célula cromafín bovina se expresan varios subtipos de canales de Ca^{2+} simultáneamente (L, N, P y Q) surge la pregunta inevitable de para qué tanto canal en una misma célula. Si damos crédito a la selectividad de las neurotoxinas para identificarlos, la secreción de catecolaminas en la célula cromafín bovina se controla por canales L y Q. En la célula cromafín de gato se expresan por igual los canales L y N, pero son los L los que dominan el proceso secretor. Estos hallazgos nos han conducido a postular la hipótesis de que ciertos subtipos de canales de Ca^{2+} que dominan el control de la secreción (los Q y L en la célula cromafín bovina, los L en la felina) se encontrarían apiñados en lugares cercanos a la maquinaria secretora. De esta manera, al despolarizarse la célula cromafín y seleccionarse sus canales de Ca^{2+}, se producirían rápidas y drásticas elevaciones de la $[Ca^{2+}]_i$, pero sólo en aquellos microdominios del subplasmalema especializados para secretar. De esta manera, el resto de la célula estaría a salvo de una exposición masiva de Ca^{2+}, que podría serle nociva. El Ca^{2+} que penetra en la célula por canales no acoplados a la maquinaria secretora (N y P en la célula cromafín bovina, N en la felina) serviría otras funciones celulares Ca^{2+}-dependientes, pero no relacionadas de inmediato con la exocitosis rápida. Si bien los canales de Ca^{2+} del tipo L poseen una rica farmacología, con clara proyección clínica en enfermedades cardiovasculares y neurológicas (angina, hipertensión, ictus o migraña), los canales no L carecen de farmacología. El reciente esclarecimiento de la estructura tridimensional de algunas neurotoxinas peptídicas permitirá utilizarlas de «molde» para el diseño y síntesis de compuestos con afinidad selectiva por uno u otro subtipo de canal de Ca^{2+} neuronal. La creciente diversidad de canales de Ca^{2+} dificulta la comprensión de su relevancia fisiológica y fisiopatológica. Pero, como contrapartida, plantea el reto de la búsqueda de antagonistas del calcio y de agonistas del calcio con una pronunciada selectividad neuronal. Varias enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer o de Parkinson), neurológicas (epilepsia) y psiquiátricas (demencias o depresión), así como los cuadros de isquemia cerebral, podrían beneficiarse de esta estrategia antes de que termine esta década del cerebro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Knight DE, Baker PF. Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. J Memb Biol 1982; 68: 107-140.
2. Knight DE, Kesteven NT. Evoked transient intracellular free Ca^{2+} changes and secretion in isolated bovine adrenal medullary cells. Proc Roy Soc B 1983; 218: 177-199.
3. O'Sullivan AJ, Cheek TR, Moreton RB, Berridge MJ, Burgoyne RD. Localization and heterogeneity of agonist-induced changes in cytosolic calcium concentrations in single bovine adrenal chromaffin cells from video-imaging of Fura-2. EMBO J 1989; 8: 401-411.
4. Uceda G, Artalejo AR, López MG, Abad F, Neher E, García AG. Ca^{2+}-activated K^+ channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. J Physiol 1992; 454: 213-230.
5. Simon SM, Llinás RR. Compartmentalization of the submembrane calcium activity during calcium influx and its significance in transmitter release. Biophys J 1985; 48: 485-498.
6. Fogelson AL, Zücker RS. Presynaptic calcium diffusion from various arrays of single channels. Biophys J 1985; 48: 1.003-1.017.
7. Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synpatic transmitter release. Trends Neurosci 1988; 11: 458-464.
8. Zimmerberg J, Sardet C, Epel D. Exocytosis of sea urchin egg cortical vesicles in vitro is retarded by hyperosmotic sucrose: kinetics of fusion monitored by quantitative light-scattering microscopy. J Cell Biol 1985; 101: 2.398-2.410.
9. Llinás R, Steinberg IZ, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postynaptic potential in squid giant synapse. Biophys J 1981; 33: 323-352.
10. Neher E, Marty A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 6.712-6.716.
11. Thomas P, Suprenant A, Almers W. Cytosolic Ca^{2+}, exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. Neuron 1990; 5: 723-733.
12. Augustine GJ, Neher E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. J Physiol 1992; 450: 247-271.
13. Michelena P, García-Pérez LE, Artalejo AR, García AG. Dissociation between cytosolic calcium and secretion in chromaffin cells superfused with calcium ramps. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 90: 3.284-3.288.

14. Fonteriz RI, García-Sancho J, Gandía L, López MG, García AG. Permeation and inactivation by calcium and manganese of bovine adrenal chromaffin cell calcium channels. Am J Physiol 1992; 263: C818-C824.
15. Neher E, Zücker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. Neuron 1993; 10: 21-30.
16. Heinemann Ch, Rüden LV, Chow RH, Neher E. A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. Eur J Physiol 1993; 424: 105-112.
17. Rüden LV, Neher E. A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. Science 1993; 262: 1.061-1.065.
18. Luebke JL, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic transmission in the hippocampus. Neuron 1993; 11: 895-902.
19. Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Multiple Ca^{2+} channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9.518-9.522.
20. Wessler I, Dooley DJ, Osswald J, Schlemmer F. Differential blockade by nifedipine and omega-conotoxin GVIA on motor nerve terminals of the rat. Neurosci Lett 1990; 108: 173-178.
21. Woodward JJ, Rezazadeh SM, Leslie SW. Differential sensitivity of synaptosomal calcium entry and endogenous dopamine release to omega-conotoxin. Brain Res 1988; 475: 141-145.
22. Dooley DJ, Lupp A, Hertting G, Osswald H. Omega-conotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. Eur J Pharmacol 1988; 148: 261-267.
23. Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature 1993; 366: 156-158.
24. Hirning LD, Fox AP, McClesky EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ et al. Dominant role of N-type Ca^{2+} channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurones. Science 1988; 239: 57-61.
25. Clasbrummel B, Osswald H, Illes P. Inhibition of noradrenaline release by ω-conotoxin GVIA in the rat tail artery. Br J Pharmacol 1989; 96: 101-110.
26. Feuerstein T, Dorley DJ, Seeger W. Inhibition of norepinephrine and acetylcholine release from human neocortex by ω-conotoxin GVIA. J Pharmacol Exp Ther 1990; 252: 778-795.
27. Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic trasmission. Science 1994; 264: 107-111.
28. López MG, Albillos A, De la Fuente M, Borges R, Gandía L, Carbone E et al. Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. Eur J Physiol 1994; 427: 348-354.
29. López MG, Villarroya M, Lara B, Martínez-Sierra R, Albillos A, García AG, et al. Q-and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of the secretion in bovine chromaffin cells. FEBS Lett 1994; 349: 331-337.
30. Schroeder TJ, Jankowski JA, Wightman M. Flame-etched carbon-fiber microelectrodes used to study the localization and kinetic time course of single exocytotic events. Seventh Intern Symp Chromaffin Cell Biology and Pharmacology. Ottawa Canadá: University of Ottawa, 1993; 74.
31. Llinás R, Sugimori M, Silver RB. Microdomains of hihg calcium concentration in a presynaptic terminal. Science 1992; 256: 677-679.
32. Albillos A, Artalejo AR, López MG, Gandía L, García AG, Carbone E. Calcium channel subtypes in cat chromaffin cells. J Physiol 1994; 477: 197-213.
33. García AG, Sala F, Reig JA, Viniegra S, Frias J, Fonteriz RI et al. Dihydropyridine Bay K 8644 activates chromaffin cell calcium channels. Nature 1984; 309: 69-71.
34. López MG, Albillos A, Artalejo AR, De la fuente MT Borges R, García AG. Two calcium entry pathways serving different functions in cat chromaffin cells. Seventh Intern. Symp. Chromaffin Cell Biology and Pharmacology. Ottawa, Canadá: University of Ottawa, 1993; Supl: 27.
35. Gandía L, Michelena P, De Pascual R, López MG, García AG. Different sensitivities to dihydropyridines of catecholamine release from cat and ox adrenals. NeuroReport 1990; 1: 119-122.
36. Jiménez R, López MG, Sancho C, Maroto R, García AG. A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and ω-conotoxin. Biochem Biophys Res Commun 1993; 191: 1.278-1.283.
37. Gandía L, Albillos A, García AG. Bovine chromaffin cells possess FTX-sensitive calcium channels. Biochem Biophys Res Commun 1993; 194: 671-676.
38. Albillos A, García AG, Gandía L. ω-Agatoxin IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. FEBS Lett 1993; 336: 259-262.
39. Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. Three types of Ca^{2+} channels trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. Nature 1994; 367: 72-76.
40. Fleckenstein A. History of calcium antagonists. Circ Res 1983; 52: (Supl 1): 3-16.
41. Yusuf S, Held P, Furberg C. Update of effects of calcium antagonists in myocardial infarction or angina in light of the Second Danish Verapamil Infarction Trial (DAVIT-II) and other recent studies. Am J Cardiol 1991; 67: 1.295-1.297.
42. Hansen JF. Secondary prevention with calcium antagonists after acute myocardial infarction. Drugs 1992; 44 (Supl 1): 33-43.
43. Deewania PC, Carbajal EV. Secondary prevention after myocardial infarction. Arch Intern Med 1993; 153: 285-287.
44. Epstein M. Calcium antagonists and renal protection: current status and future perspectives. Arch Intern Med 1992; 152: 1.573-1.584.

45. Olivera BM, Miljanich G, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the ω-conotoxins and ω-agatoxins. Ann Rev Biochem 1994; 63: 823-867.

46. Sevilla P, Bruix M, Santoro J, Gago F, García AG, Rico M. Three-dimensional structure of ω-conotoxin GVIA determined by ^{1}H NMR. Biochem Biophys Res Commun 1993; 192: 1.238-1.244.

DISCUSIÓN

M. CRIADO: ¿Cuántas clases de células cromafines hay?, o cuando hablamos de las células cromafines en la médula adrenal de distintas especies, ¿son estas células tan homogéneas?

A.G. GARCÍA: En bovino, por ejemplo, el 40% son células noradrenérgicas, el 60% adrenérgicas, en el hombre predomina fundamentalmente la adrenalina, es decir, hay variaciones en función de la especie. Lo que no existen son células que fabriquen las dos catecolaminas, aunque algunos autores han sugerido que un pequeño porcentaje serían células mixtas.

M. CRIADO: Quisiera hacerle otra pregunta, ¿es posible que la expresión de canales se afecte en cultivo?

A.G. GARCÍA: Por supuesto. Como antes ha señalado el Dr. Gandía es muy posible que la expresión de canales L y/o N se incremente con la edad de las células. Aunque muchos grupos trabajan con cultivos heterogéneos, hemos elaborado una tecnología para separar poblaciones homogéneas de células. Otra cosa que queremos hacer es trabajar en rodajas de médula adrenal. Al igual que se trabaja en rodajas de hipocampo, queremos trabajar en rodajas de médula adrenal, para conocer in situ la proporción existente de cada subtipo de canales de calcio en la célula cromafín.

V. CEÑA: En principio yo estoy absolutamente de acuerdo con una microanatomía regional de los canales, y no sólo en la célula cromafín, sino que hay otros sistemas donde parece ser por datos indirectos que también existe. Uno de estos sistemas es el hipocampo donde hay corrientes llevadas por determinados canales cuyo bloqueo no afecta la secreción de glutamato. Quería además plantearle una cuestión. Cuando se despolariza una célula con concentraciones elevadas de potasio extracelular, la señal intracelular de calcio se eleva y permanece elevada incluso durante minutos hasta que desaparece la concentración extracelular de calcio. Desde un punto de vista, digamos, electrofisiológico, pensando en la cinética de los canales, parece improbable que un canal de calcio esté abierto durante un minuto seguido en respuesta a despolarización. La pregunta es ¿qué mecanismos podrían estar implicados en este mantenimiento de una señal intracelular de calcio elevada, justo hasta que cesa el estímulo despolarizante, aunque este período de tiempo dure un minuto?

A.G. GARCÍA: Hay canales que están abiertos toda la vida, es decir, que un canal de calcio puede estar abierto minutos. Usted ha hecho experimentos aplicando hasta 5 pulsos despolarizantes y ha observado que puede haber una inactivación de canales que es gradual, y nunca vemos a los canales totalmente inactivados y totalmente activados, sino que están continuamente pasando de un estado a otro. Puede que alguno de los subtipos de canales que estamos viendo contribuyan de forma importante al mantenimiento de esa señal de calcio ya que se inactivan muy lentamente.

V. CEÑA: Es que la corriente neta de entrada en respuesta a un pulso despolarizante desaparece a los 10s, y es un hecho que bastante gente ha comprobado que un pulso despolarizante eléctrico mantiene los valores de calcio intracelular elevados incluso durante varios minutos hasta que cesa dicho pulso, mientras que sin cambios en el voltaje la corriente neta de entrada desaparece como mucho en 10 s.

J.E. ESQUERDA: Como usted ha hecho algunas referencias a la acción letal del calcio, me gustaría hacer un comentario al margen sobre la acción «vital» del calcio. Desde hace algún tiempo se conoce que las neuronas presentan dependencia de factores neurotróficos y que la retirada de estos factores comporta la muerte por apoptosis de las mismas. In vitro, este tipo de muerte neuronal se evita simplemente por la acción despolarizante de un medio de cultivo con potasio elevado; es decir, que elevaciones moderadas del calcio intracelular pueden sustituir la acción trófica mediada por factores neurotróficos. En este sentido, la señal del calcio es una señal vital.

A.G. García: En relación con su comentario, recuerdo que existe comercialmente un medio de cultivo que favorece la emisión de prolongaciones por las neuronas y que tiene una concentración ligeramente elevada de potasio; el Bay K 8644 también favorece la emisión de prolongaciones, y el factor de crecimiento nervioso eleva ligeramente las concentraciones de calcio. Estoy de acuerdo con usted en que una pequeña elevación de la concentración de calcio constituye una señal trófica para las neuronas.

J. López Barneo: Las células cromafines, como usted ha demostrado in vivo, están polarizadas funcionalmente y liberan en la zona cercana a donde está el vaso, ¿sabe si hay alguien que haya hecho experimentos para demostrar si los canales que se relacionan con la secreción, ya sean L, P o Q se distribuyen en forma de *clusters*, es decir, en cúmulos de canales? Esto parecería lógico y apoyaría la idea de que en un modelo presináptico, que es lo que en definitiva es la célula cromafín, los canales que participan en la secreción como en un terminal presináptico clásico se acumulan justo donde están las vesículas.

A.G. García: Hay dos formas de estudiar este aspecto, una mediante autorradiografía con moléculas yodadas como la ω-conotoxina GVIA, que es poco discriminativa, y otra con moléculas fluorescentes. En nuestro grupo tenemos previsto trabajar con estas moléculas fluorescentes en cuanto dispongamos de ellas. Hasta el momento, diversos grupos han comunicado datos que permiten inferir indirectamente que esto es así. El problema en estas células pequeñas como las nuestras es que estos estudios para idénticos agrupamientos de canales son difíciles.

J. Marsal: Como en las células cromafines coexisten las catecolaminas y el ATP, en nuestro modelo coexisten la acetilcolina y el ATP, y con la ω-conotoxina GVIA lo que hacemos es prácticamente no modificar la secreción de acetilcolina y en cambio inhibir totalmente la secreción de ATP. No sé si usted tiene una explicación para eso. Por el contrario, la FTX inhibe la secreción de ambos, tanto de acetilcolina como de ATP en nuestro modelo. ¿Querría preguntarle si ha estudiado la secreción de ATP utilizando estos antagonistas y si ha visto alguna modificación.

A.G. García: Tenemos datos publicados de cosecreción de catecolaminas y de ATP y no existe un paralelismo total entre ambas secreciones. Creo que todos los investigadores que trabajan en célula cromafín aceptan que las catecolaminas y el ATP están coalmacenados. A mí, personalmente, me parece difícil que de la misma célula 2 sustancias que están coalmacenadas en la misma vesícula se secreten en función de la entrada de iones calcio por vías distintas.

J. Marsal: ¿Cómo sabe que coeixsten en una misma vesícula en todas las vesículas, las catecolaminas y el ATP?

A.G. García: Eso es difícil de saber. Como usted conoce, las técnicas de separación de vesículas por centrifugación diferencial proporcionan preparaciones con una gran homogeneidad de vesículas cromafines: hasta el momento, nadie puede asegurar que se trate de un solo tipo de vesículas.

B. Soria: De los registros que mostraba usted en los que variaba la concentración de calcio, parece interfirse que existe una buena correlación entre la liberación de catecolaminas y la primera derivada de la concentración de calcio, la velocidad con la que varía la concentración de calcio. ¿Cómo se podría conciliar esta observación con algo que parece bien aceptado como son los cambios transitorios rápidos muy localizados dentro de las estructuras?

A.G. García: Creo que estos experimentos tienen la limitación de la baja resolución espaciotemporal de las técnicas que estamos utilizando. Ahora mismo estamos reconsiderando todas estas hipótesis que hemos expuesto aquí, y que se basan en estudios realizados en poblaciones celulares, con nuevos estudios en célula única; estamos midiendo simultáneamente corrientes de calcio, señal de calcio y secreción en la misma célula cromafín, y estamos empezando a manejar estas técnicas con cierta soltura. Esperamos que esta estrategia nos ayudará a corroborar o rechazar nuestra hipótesis original sobre la localización de ciertos subtipos de canales de calcio en lugares próximos a la maquinaria secretora.

M. Valdeolmillos: En la célula beta como en la célula cromafín, la secreción es dependiente de calcio. Ahora bien, después de una primera fase lo que cada vez cobra más cuerpo es que quizá el calcio no es la señal primaria, sino que la cantidad de liberación está modulada por otros segundos mensajeros, en concreto parece ser que los valores de AMP cíclico tienen un papel fundamental, ¿qué se sabe con respecto a AMP cíclico a otros segundos mensajeros en células cromafines?

A.G. García: Se sabe mucho y nada. Mucho porque hay bastante literatura y nada porque los distintos grupos de investigadores no se ponen de acuerdo en cuanto al papel del AMP cíclico y de la PKA en la regulación de la exocitosis. Sin embargo, creo que convendría tener en cuenta que la secreción total depende del calcio en un rango muy estrecho.

X. Guitart: Con respecto al AMP cíclico sólo quisiera añadir una cosa. No olvidemos que la tirosin hidroxilasa es uno de los sustratos más conocidos de la proteincinasa A y la fosforilación de la tirosinhidroxilasa es imprescindible para la síntesis de noradrenalina, por tanto, creo que en este proceso de secreción continuada, la participación de segundos mensajeros como el AMP cíclico debe ser importantísima.

FUNDACION DR. ANTONIO ESTEVE