

# 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<sup>1-3</sup>. 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).

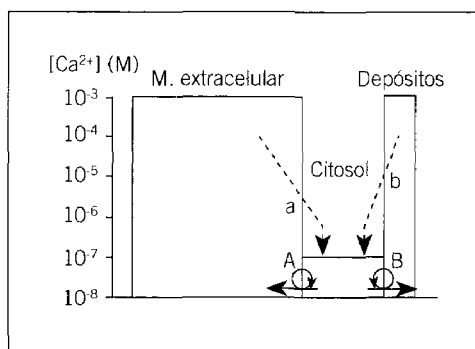


Fig. 1 Regulación de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico. Se representa el compartimiento citosólico separado del medio extracelular y de los depósitos intracelulares de calcio por las correspondientes membranas. Las bombas (A y B) transportan el  $Ca^{2+}$  contragradiente de concentración desde 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.

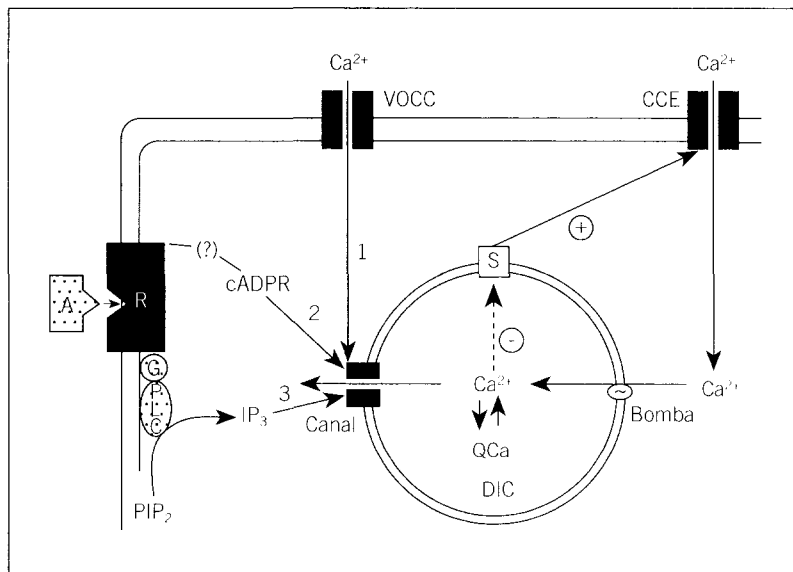


Fig. 2. Vaciamiento y llenado de los depósitos intracelulares de calcio (DIC). VOCC: canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes; CCE: entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa; A: agonista; R: receptor; PLC: fosfolipasa C, acoplada al receptor a través de una proteína G. A la izquierda se representan tres mecanismos de control del vaciamiento de los DIC (canales): 1) liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR); 2) ADP-ribosa cíclica (cADPR), y 3) inositol trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ). La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, a la derecha (bomba) bombea el  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol a los depósitos. QCa representa

calcio ligado a las proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de los depósitos. S es un sensor localizado en la membrana de los DIC, que es inhibido por  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando los DIC se vacían S es desinhibido y produce un mensajero capaz de activar CCE.

El tamponamiento por proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes dentro de los DIC (QCa en la fig. 2) permite el almacenamiento de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  con un aumento relativamente modesto de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Cuando los canales se abren, el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado al citosol y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta. Este aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  es transitorio, ya que la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenada en los depósitos es limitada y el  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática. Esto causa entrada en  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular (entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  [CCE])<sup>4</sup>, lo que mantiene la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  elevada mientras los DIC están vacíos. Una vez que los canales de los DIC se cierran, el  $\text{Ca}^{2+}$  se bombea desde el citosol hacia los DIC, y, cuando estos se han rellenado, la CCE cesa y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  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  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , compuesto de

un aumento rápido y transitorio por liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los DIC y una elevación mantenida debida a la entrada desde el medio extracelular a través de la vía capacitativa<sup>5</sup>. Incluso en la situación de reposo el escape de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los DIC hacia el citosol es relativamente rápido, ya que inhibidores selectivos de la ATPasa de los DIC, como la tapsigargina<sup>6</sup> o el ácido ciclopiazónico<sup>7</sup> causan el vaciamiento completo de los DIC en pocos minutos.

### Liberación de calcio de los depósitos intracelulares

Se conocen dos familias de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de los DIC, los receptores de ryanodina (RyRs) y los receptores de inositol-trisfosfato ( $\text{IP}_3$ Rs). 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<sup>1</sup>.

Los receptores de ryanodina<sup>3,8,11</sup> 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 movilizándolo el  $Ca^{2+}$  que contienen. Tomada de Berridge MJ.

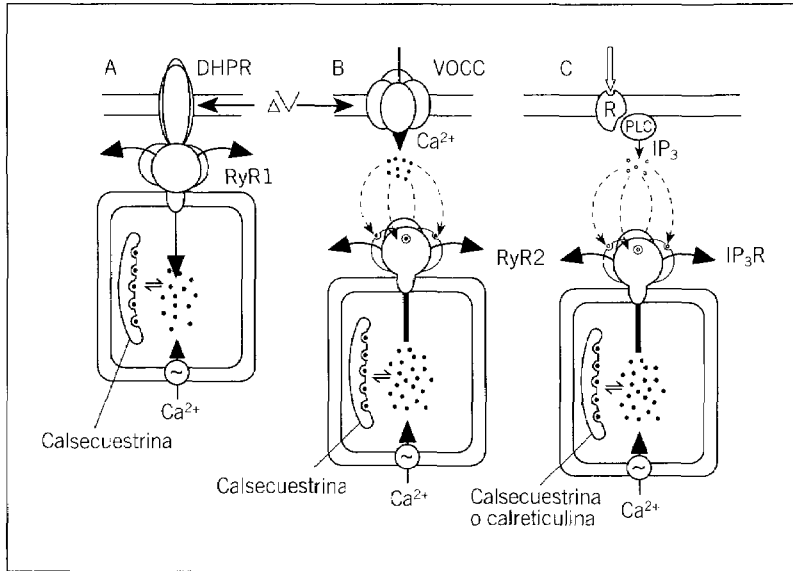


TABLA I  
EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE RYANODINA

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)<sup>11</sup>. 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<sup>9,10</sup>.

En el músculo cardíaco el canal de  $Ca^{2+}$  de los DIC es el RyR2 (fig. 3B)<sup>10,11</sup>. 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)<sup>2,13</sup>. Muchas células nerviosas poseen también RyR2 (ta-

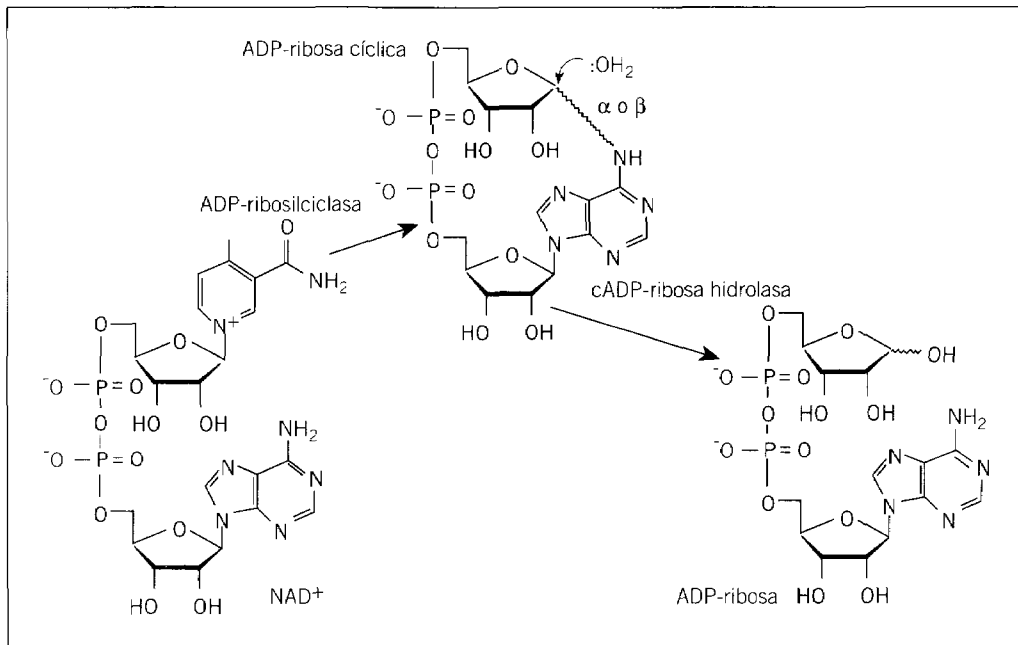


Fig. 4. Síntesis y catabolismo de la ADP-ribosa cíclica.

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

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  $\text{Ca}^{2+}$  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)<sup>15</sup>. Este mensajero se produce a partir de  $\text{NAD}^+$  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  $[\text{Ca}^{2+}]$  de reposo y de inducir liberación de  $^{45}\text{Ca}$  de vesículas de RS, pero no de microsomas de cerebro<sup>16</sup>. Su mecanismo de acción parece ser aumentar la sensibilidad

al  $\text{Ca}^{2+}$  del CICR. En las células B pancreáticas cADPR también induce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  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<sup>17</sup>.

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

Los  $\text{IP}_3$ Rs tienen una distribución casi universal en las células animales<sup>4</sup>. 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 ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol, un activador de la proteína cinasa C. El  $\text{IP}_3$  interacciona con los  $\text{IP}_3$ Rs y produce liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los DIC. La sensibilidad de los  $\text{IP}_3$ Rs al  $\text{IP}_3$  puede variar dependiendo del subtipo de receptor (se conocen cinco variedades), grado de fosforilación, entorno lipídico, contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de los DIC y  $[\text{Ca}^{2+}]$  en la vecindad. La heparina inhibe los  $\text{IP}_3$ Rs, 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 PLC $\beta$ 1 Acetilcolina, histamina, noradrenalina, serotonina, ATP, PAF, glutamato, angiotensina II, vasopresina, bradicinina, sustancia P, bombesina, neuropéptido Y, trombina, colecistocina, endotelina, neuromedina, TRH, GnRH, PTH Odorantes Luz
Transducción por receptores ligados a tirosinquinasa y PLC $\gamma$ 1 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<sup>1,18</sup>.

### Entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup>

Como se ha comentado anteriormente, las señales que resultan de la activación de la PLC son bifásicas<sup>5</sup>. Se ha propuesto que la fase tardía de entrada de Ca<sup>2+</sup> podría estar mediada también por IP<sub>3</sub>, por uno de sus derivados (IP<sub>4</sub>) o por la acción concertada de ambos<sup>18</sup>. 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<sup>2+</sup>, incubación prolongada en medio sin Ca<sup>2+</sup>) activan la entrada plasmática de Ca<sup>2+</sup> tanto o más que los agonistas naturales<sup>4</sup>. 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<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (CCE; fig. 2)<sup>4</sup>. Así pues, la mayor parte de la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por los agonistas fisiológicos sería un tanto indirecta, secundaria al vaciamiento de los DIC que inducen<sup>19</sup>. Este complejo mecanismo asegura que: 1) [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> permanece elevada mientras el agonista está presente; 2) cuando el agonista desaparece, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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<sup>4</sup>. La naturaleza del canal responsable de la entrada de Ca<sup>2+</sup> es desconocida. Recientemente se ha demostrado en mastocitos y otros tipos celulares la existencia de una corriente de entra-

da de Ca<sup>2+</sup> que se activa por vaciamiento de los DIC (I<sub>CRAC</sub>), que muy probablemente es responsable de la CCE<sup>20-22</sup>.

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

### Rellenado de los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup>

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

bloquea CCE el relleno de los depósitos es muy lento ya que, al bombearse el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a los DIC, disminuye la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y la ATPasa de los DIC deja de bombear. Cuando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  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  $\text{Ca}^{2+}$ .

### Conclusión

La activación celular por agonistas conlleva un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bifásico, con un componente rápido y transitorio, debido a liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (DIC), y otro más tardío y mantenido, debido a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en su entorno, pero son también regulados por un mensajero químico, la ADP-ribosa cíclica. La entrada tardía de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ . La existencia de esta vía de entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$  asegura la prolongación en el tiempo de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el agonista y un relleno adecuado de  $\text{Ca}^{2+}$  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

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361: 315-325.
- 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.
- Tsien RW, Tsien RY. Calcium channels, stores and oscillations. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 7:15-760.
- Putney JW, Bird GS. The inositol phosphate-calcium signalling system in non-excitabile cells. *Endocrine Rev* 1993; 14: 611-631.
- Putney JW. Calcium-mobilizing receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1987; 8: 481-486.
- Thastrup O. Role of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases in regulation of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, as studied with the selective microsomal  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitor thapsigargin. *Agents Actions* 1990; 29: 8-15.
- Demaurex N, Lew DP, Krause KH. Cyclopiazonic acid depletes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and activates an influx pathway for divalent cations in HL60 cells. *J Biol Chem* 1992; 267: 2.318-2.324.
- Fill M, Coronado R. Ryanodine receptor channel of sarcoplasmic reticulum. *Trends Neurosci* 1988; 11: 453-457.
- Ríos E, Pizarro G. Voltage receptors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *News Physiol Sci* 1988; 3: 223-227.
- Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Ann Rev Biophys Biophys Chemistry* 1989; 18: 333-364.
- Sorrentino V, Volpe P. Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 98-103.
- 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.
- Gyorke S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation: control mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in heart. *Science* 1993; 260: 807-809.
- Friel DD, Tsien RY. Phase-dependent contributions from  $\text{Ca}^{2+}$  entry and  $\text{Ca}^{2+}$  release to caffeine-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oscillations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 1992; 8: 1.109-1.125.
- Gallone A.  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release and its modulation by cyclic ADP-ribose. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 13: 304-306.
- Mszaros LG, Bak J, Chu A. Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channel. *Nature* 1993; 364: 76-79.
- Takasawa S, Nata K, Yonekura H, Okamoto H. Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic  $\beta$  cells. *Science* 1993; 259: 370-373.
- Irvine RF. Inositol-phosphates and  $\text{Ca}^{2+}$  entry: towards a proliferation or a simplification? *FASEB J* 1992; 6: 3.085-3.091.
- 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.
- Hoth M, Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 1992; 355: 353-355.
- Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 1993; 465: 359-386.
- Fasolato C, Innocenti B, Pozzam T. Receptor-activated  $\text{Ca}^{2+}$  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<sub>450</sub> 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 rianodina 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.