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 (Ca2+) como mensajero ubicuo que participa en múltiples procesos biorreguladores. Así pues, la elevación de las concentraciones citosólicas de Ca2+, [Ca²⁺], tras la activación de canales de Ca²⁺ 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 Ca2+ neuronales.

Gradientes de calcio y secreción

Para esclarecer la forma en que se modulan los fenómenos de neurosecreción por campios transitorios de la [Ca2+], se han seguido dos estrategias fundamentales. Por una parte, se ha demostrado que puede inducirse secreción de catecolaminas por [Ca2+], relativamente bajas, en el orden de 1 µM, en células cromafines bovinas permeabilizadas¹. Igualmente, la estimulación de células intactas produce cambios de la [Ca²⁺], en torno al μM durante la activación del proceso secretor24. Por otra parte, se han hecho predicciones teóricas sobre los cambios espaciotemporales de la [Ca2+], que tendrían lugar en microdominios citosólicos, en el subplasmalema en donde tiene lugar la exocitosis. Se ha calculado que durante la despolarización celular, la [Ca2+], puede incrementarse desde el nivel basal de $0,1~\mu\mathrm{M}$ hasta $10\text{-}100~\mu\mathrm{M}^{5\text{-}7}$. Estas concentraciones son considerablemente mayores que las que se detectan al medir los cambios globales promedio de la [Ca2+], 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 [Ca²⁺]_i podría ser similar. Sin embargo, la velocidad inicial de la secreción se aceleraría de manera considerable por [Ca²⁺], elevadas8. 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 [Ca²⁺], 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 neuronasº célu as cromafines¹º o célutas de la hipófisis anteriora, puedan hacerlo porque las [Ca2+], que se alcanzan en dominios exocitóticos son sustancialmente más elevadas que las que se han utilizado en células permeabilizadas.

Augustine y Neher¹² estudiaron la Ca²⁻⁻ dependencia de la secreción en células cromafines individuales, midiendo simultáneamente la capacitancia eléctrica de la célula como índice de exocitosis, y la [Ca²⁺]; con fura-2. Encontraron que la diálisis intracelular de Ca2+ con una pipeta de patch-clamp disparaba la secreción. La secreción se incrementó cuando las [Ca²⁺]_i

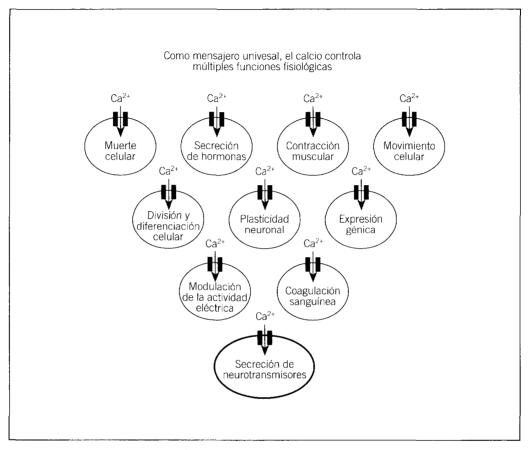


Fig. 1. Multiplicidad de funciones biológicas controladas por señales desencadenadas por incrementos transitorios de la concentración citosólica del catión Ca²⁺. En el vértice de la pirámide destaca la secreción de neurotransmisores porque es la función fisiológica elegida para ilustrar la temática de 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 [Ca²⁺], de 2. La aplicación de pulsos despolarizantes breves produjo incrementos transitorios tanto de la [Ca²⁺]_i como de la secreción. La comparación de las velocidades de secreción durante estas despolarizaciones, con las producidas por la diálisis de Ca2+, sugiere que, durante la despolarización celular, la [Ca²⁺], que se alcanza en dominios subplasmalemales de secreción puede ser mayor de $10 \,\mu\text{M}$. La medición promedio de la [Ca²⁺], en células intactas indica cambios mucho menores. Por ello, cabe concluir que durante la despolarización, deben producirse gradientes espaciales muy acusados de la [Ca²⁺]..

Para el estudio de gradientes de Ca²⁺ y secreción en células cromafines bovinas, utilizamos en nuestro laboratorio una estrategia diferente¹³. Se midieron los cambios de la [Ca²⁺], y la secreción de catecolaminas en células estimuladas con una solución despolarizante (100 mM de K+). Una vez despolarizadas, se ofreció a las células Ca2+ o Ba2+ 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 [Ca²⁺], y el curso temporal de la respuesta secretora. Con el escalón de Ca2+ se apreció un incremento paralelo de la [Ca²⁺], y la secreción, que alcanzó un pico en pocos se-

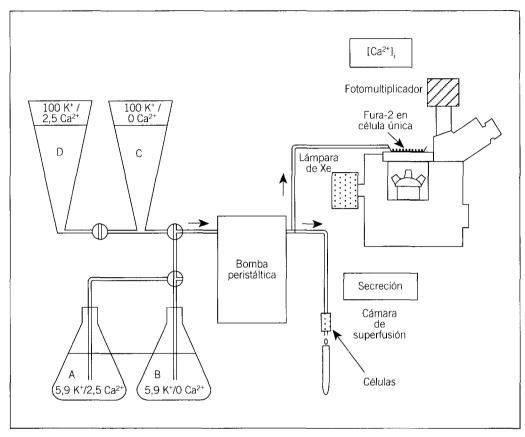


Fig. 2. Dispositivo utilizado para el estudio de gradientes de cationes divalentes Ca^{2+} y Ba^{2+} , y su influencia sobre el proceso de secreción de catecolaminas en células cromafines aisladas de médula suprarrenal bovina, y mantenidas en cultivos primarios. Los recipientes D y C son los utilizados 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 $[Ca^{2+}]$, 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 $[Ca^{2+}]$, y secreción de catecolaminas. Adaptado de Michelena P et al¹².

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 $0,4\,\mu\text{M}$. 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 Ca²+ 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 [Ca²+], permaneció elevada en una meseta. Si en vez de Ca²+ se aplican escalones o rampas de Ba²+, 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 $[Ca^{2+}]$, que se alcanza en un momento dado, y son compatibles con las siguientes conclusiones: I) la velocidad de secreción depende de la existencia de un gradiente de Ca^{2+} muy acusado, que permita alcanzar $[Ca^{2-}]$, muy elevadas $(10\text{-}100\,\mu\text{M})$ 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 $[Ca^{2+}]$ -dependiente de los canales de Ca^{2+} contribuye a disipar ese gradiente de Ca^{2-} y a regular la secreción Ca^{2+}

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 Ca2+ a través de una pipeta de patch es considerablemente menor, para una determinada [Ca2+], que la observada en respuesta a despolarizaciones breves (Ca2+ extracelular que penetra en la célula por canales de Ca²⁺)¹². Por otra parte, la cantidad total de secreción es siempre mucho mayor con la diálisis de Ca²⁺ que con la elevación rápida de la [Ca²⁺], por despolarización. Neher y Zücke⁻¹⁵ utilizaron DM-nitrofeno (un compuesto que une Ca²⁺ y lo libera rápidamente por fotólisis) para investigar la cinética de la secreción Ca²⁺dependiente en células cromafines bovinas. La fotólisis produjo la elevación de la [Ca²⁺], 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 Ca²⁺-dependientes. En base a ello, Heinemann et al¹⁶ 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 [Ca²⁻]_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 incrementadas¹⁷.

Canales de calcio y neurosecreción

Conocer cuál es la participación de cada subtipo de canal de Ca²⁺ (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 [Ca²⁺], en microdominios neuronales constituye, ahora mismo, uno de los temas de investigación más candentes en neurociencia.

Ante esta creciente diversidad de canales de Ca²⁺, 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 acetilcolina²⁰, de dopamina^{19,21} y de noradrenalina²². Otros estudios muestran un papel predominante de los canales no N no L en la liberación de neurotransmisores en sinapsis centrales²³. 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 al²⁴ 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 al²⁵ y Feuerstein et al²⁶. Más recientemente, Wheeler et al²⁷ han descrito que tanto los canales de Ca2+ 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 Ca²+ 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 GVIA²ª. En la célula cromafín bovina, el patrón observado parece ser mucho más complejo. Los canales tipo L suponen tan sólo un 15-20% cuando se estudian las corrientes globales de Ba²⁺; 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 Ca2+, denominado Q, en la membrana de la célula cromafín bovina, dato que parece confirmarse por estudios electrofisiológicos²⁹.

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 al³⁰ 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 amperométricas¹⁷. 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 Neher¹² llegaron a la conclusión de que la [Ca²⁺], subplasmalemal, durante la despolarización celular, podría alcanzar valores de decenas de μ mol. Para generar esta señal de Ca²⁺ tan drástica y versátil, se impone el esbozo de una nueva hipótesis. Para poder elevar la [Ca²⁺]; así, los canales de Ca²⁺ deberían apiñarse cerca de las zonas activas exocitóticas. Es decir, los canales de Ca2+ que suministran el Ca²⁺ 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 al³¹ 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 [Ca²⁺], 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 Ca2+, puede detectar cambios de decenas de μmol en la concentración citosólica del catión. Con esta precisa estrategia demostraron la existencia de transientes de [Ca²⁺], 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 [Ca²+]. Sin embargo, tiene la ventaja de que posee varios subtipos de canales de Ca²+ (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 Ca²+ posee con la maquinaria secretora y planteado la hipótesis de que determinados subtipos de canales de Ca²+ se encuentren más cercanos que otros al dispositivo secretor.

En células cromafines de gato, el análisis cinético y farmacológico de corrientes globales de Ca²⁺ y Ba²⁺ reveló la presencia mayoritaria de canales de Ca²⁺ N y L³². 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 L³³. 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺, producida por pulsos breves de K+ elevado aplicados a células cromafines felinas cargadas con fura-2, esta se redujo un

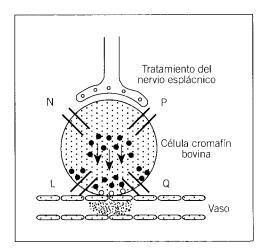


Fig. 3. Esquema de la sinapsis colinocromafín en la médula de la glándula suprarrenal intacta. Modelo que propone la distinta localización geográfica de los distintos subtipos de canales de Ca²⁺ para explicar el bloqueo selectivo de la secreción de catecolaminas a la circulación, por agentes que afectan canales de Ca2+ voltajedependientes L o Q, pero no los P o N. Los canales aleiados de la maquinaria secretora pueden surtir de Ca²⁺ 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 advacente al plasmalema, la activación de enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas mediante fosforilaciones Ca2+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 Ca²+ al interior celular. Pero el Ca²+ 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 Ca²+ del subtipo L tendrían que ubicarse en la inmediata vecindad de los sitios activos de exocitosis en el plasmalema²8,34.

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 Ca²⁺ parece más hete-

rogénea que la felina. De hecho, en la célula cromafín bovina hemos disecado al menos cuatro subcomponentes en sus corrientes globales de Ca²⁺, 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 Ca²⁺ 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 IVA²⁹. La reciente disponibilidad de MVIIC nos ha permitido encontrar el eslabón perdido en esa compleja cadena de múltiples canales de Ca2+ 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 Ca²⁺ (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 Ca2+ y la secreción, esta mediante la capacitancia eléctrica de la membrana³⁹. En este estudio se concluye que la corriente global de Ca²⁺ 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 al³⁹ utilizaron técnicas de patch-clamp y capacitancia para medir corrientes de Ca2+ y secreción, respectivamente. Nosotros utilizamos técnicas de patch-clamp para medir corrientes, amperometría y fluorescencia para cuantificar secreción y, además, cuantificamos la captación de 45Ca2+ y medimos los cambios de la [Ca2+]_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 al³⁹ a canales L, N y P constituye una discrepancia tan drástica que es difícil de reconciliar 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺. Pero sólo el Ca²⁺ 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 μ mol. 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺-dependientes. Sin embargo, los valores de [Ca²⁺], 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 [Ca2+], 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 Ca²⁺ es un mecanismo citotóxico que puede causar su muerte. De hecho, se acepta que la excesiva entrada de Ca²⁺ 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 Ca²⁺ en neuronas se ha asociado también a enfermedades neurodegenerativas de evolución crónica del tipo enfermedad de Alzheimer o de Parkinson. El Ca²⁺ 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 Ca2+ se hayan canalizado hacia la prevención de la entrada y la sobrecarga celular de Ca2+.

Los denominados actualmente antagonistas del calcio⁴⁰, bloqueadores de la entrada de Ca²⁺. o bloqueadores de canales de Ca²⁺ 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 va 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 Ca²⁺ 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 miocardio⁴¹⁻⁴³; 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 ciclosporina44.

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 Ca2+ 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 neuroprotectores⁴⁵. Por ejemplo, con una única invección en bolo de ω conotoxina MVIIA (MVIIA), un inhibidor reversible de los canales de Ca²⁺ 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 Ca²⁺ neuronales está condicionado por su limitada difusión (no atraviesan la barrera hematoencefálica) v 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 Ca²⁺. 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 protones⁴⁶. La estructura es globular: la molécula en solución se dobla v 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 Ca²⁺ del subtipo N.

Otra importante pregunta por contestar se relaciona con la definición del número de canales de Ca²+ 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 Ca²+ 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺.

Resumen

Dada la diversidad de funciones fisiológicas que controla el catión Ca²⁺, no debe soprendernos el creciente número de subtipos de ca-

nales de Ca²⁺ 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 Ca2+ 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 Ca²⁺ 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 Ca2+, se producirían rápidas y drásticas elevaciones de la [Ca²⁺], 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 Ca2+, que podría serle nociva. El Ca2+ 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 Ca²⁺-dependientes, pero no relacionadas de inmediato con la exocitosis rápida. Si bien los canales de Ca2+ 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 Ca2+ neuronal. La creciente diversidad de canales de Ca²⁺ 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

- 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.
- Knight DE, Kesteven NT. Evoked transient intracellular free Ca²⁺ changes and secretion in isolated bovine adrenal medullary cells. Proc Roy Soc B 1983: 218: 177-199.
- 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.
- Uceda G, Artalejo AR, López MG, Abad F, Neher E, García AG. Ca²⁺-activated K+ channels modulate muscarinic secretion in cat chromaffin cells. J Physiol 1992; 454: 213-230.
- 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.
- Fogelson AL, Zücker RS. Presynaptic calcium diffusion from various arrays of single channels. Biophys J 1985; 48: 1.003-1.017.
- Smith SJ, Augustine GJ. Calcium ions, active zones and synpatic transmitter release. Trends Neurosci 1988; 11: 458-464.
- 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.
- Llinás R, Steinberg IZ, Walton K. Relationship between presynaptic calcium current and postynaptic potential in squid giant synapse. Biophys J 1981; 33: 323-352.
- 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.
- Thomas P, Suprenant A, Almers W. Cytosolic Ca²⁺, 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.
- 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.

- 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.
- Neher E, Zücker RS. Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. Neuron 1993; 10: 21-30.
- 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.
- 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.
- Luebke JL, Dunlap K, Turner TJ. Multiple calcium channel types control glutamatergic transmission in the hippocampus. Neuron 1993; 11: 895-902.
- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 9.518-9.522.
- Wessler I, Dooley DJ, Osswald J, Schlemmer F. Differential blockade by nifedipine and omegaconotoxin GVIA on motor nerve terminals of the rat. Neurosci Lett 1990; 108: 173-178.
- Woodward JJ, Rezazadeh SM, Leslie SW. Differential sensitivity of synaptosomal calcium entry and endogenous dopamine release to omegaconotoxin. Brain Res 1988; 475: 141-145.
- Dooley DJ, Lupp A, Hertting G, Osswald H. Omegaconotoxin GVIA and pharmacological modulation of hippocampal noradrenaline release. Eur J Pharmacol 1988; 148: 261-267.
- Takahashi T, Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. Nature 1993: 366: 156-158.
- sion. Nature 1993; 366: 156-158.

 24. Hirrning LD, Fox AP, McClesky EW, Olivera BM, Thayer SA, Miller RJ et al. Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of norepine-phrine 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.
- 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 Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic trasmission. Science 1994; 264: 107-111.
- 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 Ca²⁺ channels dominate the control of the secretion in

- bovine chromaffin cells. FEBS Lett 1994; 349: 331-337.
- Schroeder TJ, Jankowski JA, Wightman M. Flameetched 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.
- Llinás R, Sugimori M, Silver RB. Microdomains of hihg calcium concentration in a presynaptic terminal. Science 1992: 256: 677-679.
- minal. 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.
- 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.
- 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 IVAsensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. FEBS Lett 1993; 336: 259-262.
- Artalejo CR, Adams ME, Fox AP. Three types of Ca²⁺ 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.
- 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.
- 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 trabajar 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 im-

- probable 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: És 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. LOPEZ 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. GARCIA: 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: Esó 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.