

# Canales para iones en las membranas neuronales

GABRIEL COTA\*

## SEÑALES ELÉCTRICAS NEURONALES

El funcionamiento del sistema nervioso depende en gran medida del manejo de señales eléctricas por las células nerviosas. Las neuronas son capaces de generar, integrar y conducir diversas señales eléctricas, y pueden además comunicarse entre sí, o con células efectoras, como las musculares y secretoras, mediante ese tipo de señales.

Las señales eléctricas neuronales incluyen a los potenciales de receptores sensoriales, los potenciales sinápticos, los potenciales marcapaso y los potenciales de acción. Los tres primeros grupos son designados con el nombre genérico de potenciales graduados. Tanto los potenciales de acción como los potenciales graduados son de muy variada amplitud y duración entre diferentes tipos de neuronas, o aún en diferentes regiones de una misma neurona, y cumplen asimismo con muy diversos propósitos. Por ejemplo, la figura 1 ilustra la diversidad en forma, y en menor grado en amplitud, de los potenciales de acción generados por diferentes membranas neuronales. No obstante, existe un común denominador, y es que todas las señales eléctricas neuronales son cambios transitorios en el "potencial de membrana", es decir en el voltaje o diferencia de potencial eléctrico que normalmente existe entre las caras externa e interna de la membrana plasmática. Estos cambios dependen de la actividad de los canales iónicos.

## ¿QUÉ SON LOS CANALES IÓNICOS?

Todo cambio de voltaje está asociado a un flujo de cargas eléctricas, y en el caso de las señales neuronales la corriente eléctrica se origina en el movimiento de iones inorgánicos (sodio, potasio, calcio, y cloruro) a través de la membrana plasmática. Los iones se mueven en el interior de la membrana siguiendo rutas proporcionadas por proteínas.

Al igual que en otras células, la membrana plasmática de las neuronas está constituida por una bicapa lipídica en la cual se encuentran embebidas proteínas diversas. Algunas de estas proteínas están especializadas para transportar iones. Sin las proteínas transportadoras la permeabilidad de la membrana a

iones sería prácticamente nula, ya que la bicapa de lípidos constituye una barrera formidable para el paso de partículas que poseen carga eléctrica neta.

Los canales iónicos constituyen una clase particular de estas proteínas transportadoras en la membrana y funcionan como vías de permeabilidad para el movimiento pasivo de los iones inorgánicos. La vía para el paso de iones es un poro hidrofílico o túnel en la proteína del canal, que comunica al medio extracelular con el intracelular. Casi todo el flujo de iones que da origen a las señales eléctricas en las neuronas y otras células



\* Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

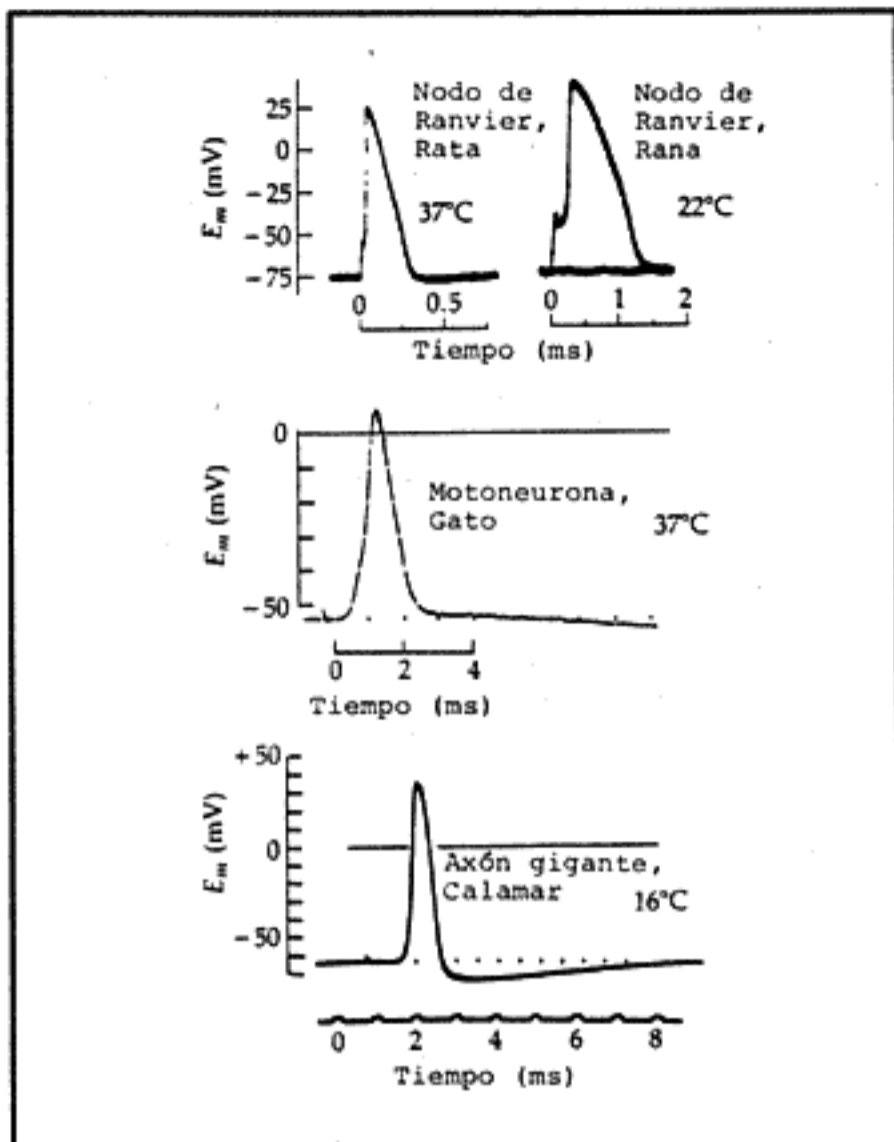


Figura 1. Potenciales de acción. Los registros ilustran los cambios transitorios en la diferencia de potencial eléctrico transmembranal,  $E_m$ , que ocurren en diversas regiones de diferentes neuronas durante un potencial de acción. En cada caso, el potencial de acción fue inducido mediante estímulos despolarizantes, y el cambio en  $E_m$  se registró con un electrodo conectado al medio intracelular. Es posible distinguir varias fases en cada uno de los potenciales de acción: fase de ascenso, de espiga o pico, de repolarización, y de postpotencial. Durante esta última, el potencial de membrana puede ser aún más negativo de lo que es en reposo, como resulta claro en el caso del axón gigante del calamar.

excitables se efectúa a través de los canales iónicos. Estas proteínas de membrana son entonces elementos centrales en la generación, conducción y comunicación intercelular de las señales eléctricas neuronales.

Considerando lo anterior, es obvio que el conocimiento de las propiedades de los canales iónicos resulta de gran utilidad para entender el funcionamiento de los sistemas nerviosos a nivel celular.

#### PROPIEDADES FUNDAMENTALES DE LOS CANALES IÓNICOS

La mayoría de los canales iónicos conocidos presenta las siguientes dos propiedades: 1) Los canales constituyen vías dinámicas de permeabilidad, ya que pueden estar en una de dos clases de estados: cerrados o abiertos, y 2) Los canales no dejan pasar en forma indiscriminada a todo tipo de iones, sino que son capaces de seleccionar a una o más especies iónicas de las restantes. Por ejemplo, algunos canales permiten el paso de sodio pero son prácticamente impermeables a los demás iones. Otros canales son casi igualmente permeables a sodio y a potasio, pero no dejan pasar iones calcio ni aniones, como el cloruro.

Estas propiedades de los canales iónicos son extraordina-

riamente importantes para el manejo de información por las neuronas. Por un lado le confieren a la membrana plasmática su característica permeabilidad selectiva a iones y hacen posible, por otra parte, que ésta pueda cambiar de un instante a otro, lo cual resulta en cambios en la corriente iónica a través de la membrana y, por consiguiente, en cambios en el voltaje transmembranal.

#### ¿QUÉ FUERZAS IMPULSAN AL MOVIMIENTO DE LOS IONES?

La célula no invierte energía en forma directa para promover el paso de iones a través de un canal iónico abierto, pues los iones difunden por el poro hidrofílico moviéndose a favor de su gradiente electroquímico, tal como se describe a continuación. El potencial de membrana en una neurona en reposo (aquella que no está generando o conduciendo una señal eléctrica) es de -50 a -90 mV, negativo el interior respecto al exterior (véase la figura 1). Este "potencial de reposo" depende de la presencia de gradientes de concentración de iones a través de la membrana y se origina porque la permeabilidad de la membrana en reposo, aunque pequeña en términos absolutos, es mucho mayor para potasio que para los otros iones.

Los gradientes de concentración de iones son generados y mantenidos por el funcionamiento de otras clases de proteínas transportadoras en la membrana, incluyendo a las denominadas bombas iónicas e intercambiadores iónicos. Las bombas transportan a los iones a través de la membrana en contra de sus gradientes de concentración, utilizando la energía derivada de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP) intracelular. Un ejemplo es la bomba (o ATPasa) que transporta iones sodio y potasio, presente en la membrana plasmática de prácticamente todas las células animales. En estos procesos de transporte activo las células invierten directamente energía, producto del metabolismo de diferentes compuestos químicos.

Los intercambiadores, por su parte, transportan a un cierto ion en contra de su gradiente electroquímico aprovechando el gradiente de concentración ya existente para un segundo ion. Por ejemplo, el intercambiador Na-Ca, también muy común en la membrana de las células animales, tiene la capacidad de transportar iones calcio desde el medio intracelular, donde son escasos, hacia el medio extracelular, donde están mucho más concentrados, acopladamente con el transporte de iones sodio en el sentido opuesto.

Como resultado de la actividad de los sistemas de bombeo y de intercambio, los iones están distribuidos desigualmente a través de la membrana plasmática neuronal. Así, la concentración extracelular de sodio es aproximadamente 10 veces mayor que la concentración intracelular del mismo ion. De igual manera, la concentración externa de cloruro es mayor que la interna. Lo contrario ocurre para los iones potasio, pues están mucho más concentrados (10 a 20 veces) adentro que afuera. La diferencia de concentraciones a través de la membrana es aún más marcada para los iones calcio, siendo su concentración en el medio extracelular 3 a 4 ordenes de magnitud mayor que en el citoplasma.

Con la anterior condición de reposo, la apertura de canales en la membrana, selectivos a iones sodio, da lugar a un flujo neto de estos iones desde el medio extracelular al medio intracelular. Los iones sodio entran a la célula porque están más concentrados afuera y porque el potencial eléctrico adentro es negativo respecto al exterior. Cuando se abre un número grande de canales de sodio, la entrada de los iones (cationes mono-

valentes) da como resultado que la magnitud del voltaje transmembranal disminuya (es decir, la membrana se despolariza) e incluso el potencial de membrana puede invertirse de signo, tal como ocurre durante las fases de ascenso y pico de un potencial de acción (figura 1).

Cabe hacer notar que el número de iones sodio que tienen que entrar a la célula para que el potencial de membrana cambie de  $-70$  a  $+30$  mV, por ejemplo, usualmente no altera en forma significativa las concentraciones intra y extracelulares de este ion: el movimiento de los iones tiene consecuencias eléctricas, pero no químicas. De todos modos, en el caso de que la concentración de sodio se viera significativamente alterada, el gradiente de concentración sería reestablecido por los sistemas de bombeo activo o de intercambio.

Hemos visto que el gradiente electroquímico para iones sodio en una neurona en reposo favorece (o impulsa) la entrada de sodio. La misma situación se da para los iones calcio y para cloruro, pero para potasio ocurre lo contrario: el gradiente electroquímico impulsa la salida del mismo. Esto puede ser descrito en forma cuantitativa. Así, mediante la ecuación de Nernst es posible calcular la diferencia de potencial eléctrico transmembranal equivalente al gradiente de concentración de un cierto ion, valor designado con el nombre de potencial de equilibrio para el ion de que se trate, y que usualmente se simboliza como  $E_i$ , donde  $i$  es el ion en cuestión.

En una membrana permeable exclusivamente al ion  $i$ , el voltaje transmembranal en el equilibrio es igual a  $E_i$ . Valores típicos para  $E_{Na}$ ,  $E_K$ ,  $E_{Ca}$ , y  $E_{Cl}$  son  $+50$  mV,  $-90$  mV,  $+150$  mV y  $-80$  mV, respectivamente. Entre mayor la magnitud de la diferencia entre el potencial de membrana real ( $E_M$ ) y el potencial de equilibrio para sodio ( $E_{Na}$ ), por ejemplo, mayor la fuerza impulsora para el movimiento pasivo de sodio a través de la membrana. El signo de tal diferencia indica la dirección del movimiento del ion; si es negativa el sodio entra, si es positiva sale. La magnitud de la corriente transportada por el sodio puede ser calculada multiplicando el valor de la fuerza impulsora ( $E_M - E_{Na}$ ) por la conductancia eléctrica de la membrana a sodio ( $G_{Na}$ ). Esta conductancia es directamente proporcional al número de canales selectivos a sodio que se encuentren abiertos.

### TRES FAMILIAS DE CANALES IÓNICOS

Podemos imaginar que los estados abiertos y cerrados de los canales iónicos corresponden a diferentes estados conformacionales de la proteína que constituye al canal. De esta manera, la transición de un estado a otro queda explicada por cambios conformacionales en la proteína. Lo que determina que un canal iónico particular esté cerrado o abierto, es un estímulo adecuado. Es decir, los canales son elementos excitables, ya que son capaces de reconocer al estímulo y de responder cerrándose o abriéndose, según el caso. Clásicamente, los canales iónicos han sido clasificados en dos grandes grupos o familias en base al mecanismo que controla la apertura y cierre de los mismos: canales dependientes de ligandos y canales dependientes del voltaje (figuras 2A y B).

En los canales dependientes de ligandos la transición entre los estados cerrado y abierto es gobernada por la unión de un ligando específico a una región receptora de la proteína que constituye al canal (figura 2A). En otras palabras, en este tipo de canales iónicos, la unión del ligando favorece, mediante una reacción alostérica, uno de los dos tipos de estados, cerrado o abierto, y estabiliza inicialmente a la proteína en ese estado

conformacional. En la ausencia del ligando, el estado contrario es el que resulta favorecido.

El ligando tiene usualmente un peso molecular pequeño, y con frecuencia se trata de un neurotransmisor o de un mensajero químico intracelular. Los miembros de esta familia de canales toman su nombre del ligando natural que resulte más efectivo en inducir la transición de estados. Así, los canales de acetilcolina son aquellos sensibles a ese neurotransmisor. Cuando el poro hidrofílico y el sitio que reconoce al ligando se encuentran en la misma proteína, el término canal es reemplazado por el de receptor. En este contexto, cuando se habla del "receptor a la acetilcolina", presente en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular, también se está haciendo referencia, en forma implícita, al canal iónico asociado.

Algunos canales dependientes de ligandos son controlados indirectamente por estímulos en el medio extracelular. En estos casos, los estímulos son reconocidos por moléculas receptoras en la membrana, que están separadas de los canales. La interacción de un estímulo dado con su receptor promueve la producción de un mensajero químico intracelular, y éste induce la transición de estados del canal.

La otra gran familia "clásica" de canales iónicos, los dependientes del voltaje, está constituida por canales que responden a los cambios en  $E_M$  (figura 2B). La fracción de este tipo de canales en el estado abierto depende del campo eléctrico en el interior de la membrana plasmática. ¿Cómo es que estos canales son capaces de responder en forma directa a los cambios en  $E_M$ ? La respuesta obligada es que poseen sensores de voltaje. Estos sensores podrían ser grupos ionizados o dipolos en las cadenas laterales de los aminoácidos del canal, que transducen

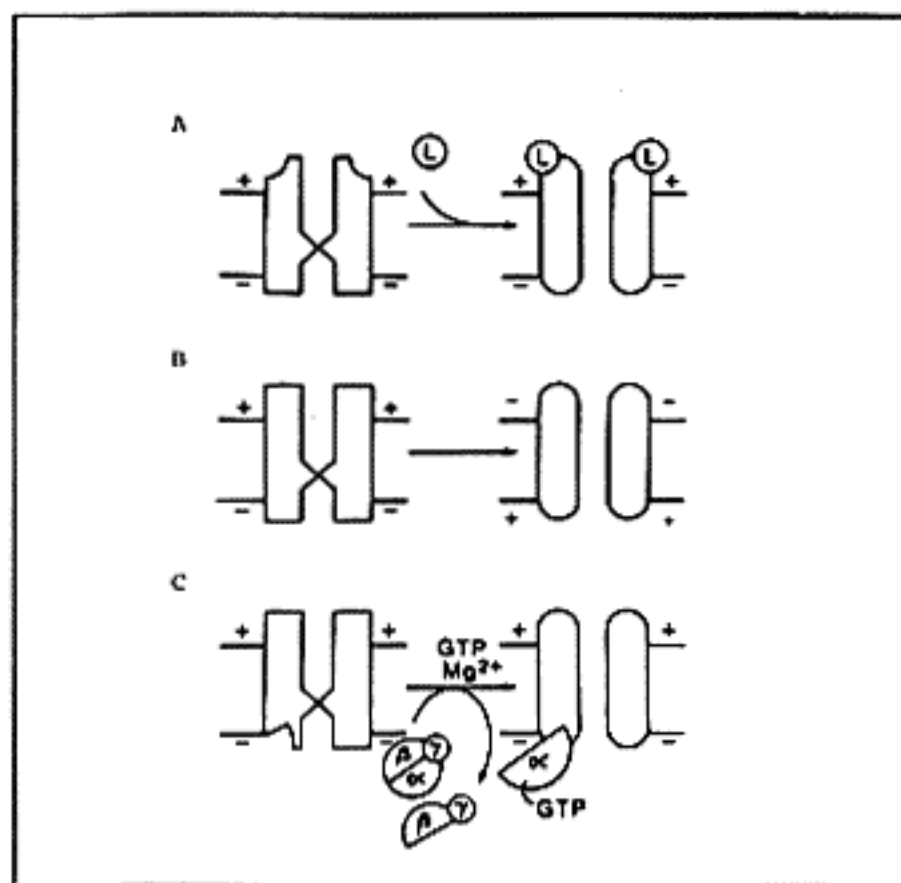


Figura 2. Tres mecanismos que pueden regular la apertura de los canales iónicos. Los esquemas tratan de enfatizar que la transición del estado cerrado al abierto involucra un cambio conformacional en la proteína del canal. La conformación que corresponde al estado abierto es estabilizada en estos ejemplos por uno de tres posibles mecanismos: A) la unión de un ligando extracelular (L) a ciertos sitios receptores del canal; B) el cambio del voltaje transmembranal, o C) la interacción de la subunidad alfa de una proteína G con el canal. (Ver texto).



rían los cambios en el campo eléctrico en cambios conformacionales de la proteína.

Al igual que los canales dependientes de ligandos, los dependientes del voltaje seleccionan entre las diferentes especies iónicas. El nombre de un tipo particular de canal dependiente del voltaje queda establecido por el ion inorgánico al cual es más permeable en condiciones fisiológicas. Así, existen canales de sodio (que permiten el paso de iones sodio, no que están hechos de sodio), de calcio, de potasio, y de cloruro, entre otros.

Conviene señalar que en las condiciones fisiológicas los canales dependientes del voltaje participan en circuitos de realimentación, pues su actividad da como resultado cambios en el voltaje transmembranal, lo cual a su vez modifica de nueva cuenta la actividad de los canales. De hecho, la generación y conducción de potenciales de acción se basa en la operación de tales circuitos de realimentación.

Muy recientemente Brown y Birnbaumer han propuesto la existencia de una tercera familia de canales iónicos, los regulados directamente por proteínas G (figura 2C). Estas proteínas están también asociadas a la membrana, y se les denomina G porque requieren del trifosfato de guanosina (GTP) para ser activas. Actualmente se sabe de la existencia de cerca de diez diferentes proteínas G, y la lista está creciendo con rapidez. Todas ellas son proteínas oligoméricas, constituidas por tres subunidades, denominadas alfa, beta y gama, en orden decreciente de masa. Las subunidades beta y gama, pero no las alfa, son muy parecidas de un tipo de proteína G a otro. Hasta hace poco, se pensaba que las proteínas G actuaban solamente como un eslabón intermedio en la regulación de la síntesis de mensajeros químicos intracelulares ("segundos mensajeros") por hormonas y neurotransmisores ("primeros mensajeros"). Se sabe ahora que la subunidad alfa de algunas proteínas G es capaz de interactuar con algunos canales iónicos, y que tal interacción determina la apertura o cierre de esos canales.

Conviene hacer dos aclaraciones a la anterior clasificación de los canales iónicos. La primera es que los tres mecanismos de regulación de la apertura y cierre de los canales, unión de ligandos, cambios de  $E_M$  e interacción con proteínas G, no son mutuamente excluyentes. Por ejemplo, el canal de acetilcolina presente en la membrana postsináptica de la unión neuromuscular responde secundariamente a los cambios en el voltaje transmembranal. Asimismo, el funcionamiento de algunos canales de potasio y de calcio dependientes del voltaje es modulado por hormonas y neurotransmisores, y tal modulación es mediada, directa o indirectamente por proteínas G. Aún más, en algunos canales dependientes del voltaje y selectivos a cationes, la apertura y cierre podría estar regulada por la combinación de dos procesos diferentes: cambios conformacionales de la proteína del canal en respuesta a la alteración del voltaje transmembranal y unión o desunión de uno o varios iones calcio en el interior del poro iónico.

La segunda aclaración es que esa clasificación no comprende a otros dos importantes grupos de canales iónicos, los de las uniones comunicantes y los activados por el estiramiento de la membrana. Los primeros comunican a una célula con otra vecina, constituyendo vías intercelulares de baja resistencia eléctrica, y son permeables a los iones inorgánicos así como a algunas moléculas de bajo peso molecular. Los segundos están presentes en la membrana plasmática de diversos receptores sensoriales, en donde funcionan como transductores mecanoelectrónicos. La deformación mecánica de la membrana, mediante



un mecanismo molecular todavía desconocido, regula la apertura y cierre de estos canales sensibles al estiramiento.

Cada célula individual no expresa en su membrana plasmática a todos los tipos conocidos de canales iónicos, sólo a algunos. La distribución de los canales iónicos además no es homogénea en las diferentes regiones de la membrana plasmática de una misma célula. Así, en las neuronas, los canales dependientes de ligandos son generalmente más abundantes en las regiones de la membrana plasmática cercanas a los contactos sinápticos, mientras que los diferentes tipos de canales dependientes del voltaje están localizados en algunas regiones de las dendritas, así como en las membranas somática, axonal y de las terminales presinápticas.

#### DE HODGKIN Y HUXLEY A NUMA

Al igual que en otras áreas de las ciencias experimentales, el avance del conocimiento en el campo de los canales iónicos ha estado condicionado a innovaciones metodológicas que han permitido el estudio cada vez más detallado de los mecanismos de operación de estas proteínas de membrana. Este conocimiento está todavía lejos de ser completo, pero actualmente estamos siendo testigos de logros espectaculares, como resultado de los nuevos enfoques multidisciplinarios que están siendo ahora aplicados al estudio de diversos canales iónicos. El siguiente es un breve bosquejo del desarrollo del conocimiento acerca de los canales iónicos dependientes del voltaje.

Hasta mediados de la década de los setenta, el estudio de los canales iónicos había venido siendo un campo casi exclusivo de los electrofisiólogos. Hasta esa fecha buena parte del conocimiento de los mecanismos de operación de los canales iónicos dependió de la utilización de una técnica de registro denominada control o fijación del voltaje. Esta técnica fue de-

sarrollada por Cole y sus colaboradores a finales de los cuarenta, y en manos de Alan Hodgkin y Andrew Huxley permitió que a principios de los cincuenta se tuviera por primera vez una descripción completa, cualitativa y cuantitativa, de las corrientes iónicas involucradas durante el potencial de acción en una membrana neuronal, el axón gigante del calamar.

La técnica de fijación del voltaje implica el control espacial y temporal del voltaje transmembranal durante la apertura o cierre de los canales iónicos, y permite medir las corrientes iónicas a través de la membrana que son inducidas al aplicar cambios casi instantáneos en  $E_M$ . De esa manera es posible conocer de que manera los canales iónicos se abren o cierran en función de  $E_M$  y del tiempo.

Para estudiar con detalle las propiedades funcionales de un cierto tipo de canal iónico bajo fijación del voltaje, es muy conveniente que la corriente iónica que fluye a través de los canales de interés sea aislada de las corrientes iónicas que lo hacen a través de otros tipos de canales, que pudiesen estar presentes en la región de la membrana que está siendo investigada. Con tal fin, en un experimento dado, el movimiento de los iones que no resultan de interés es anulado mediante su sustitución por otros iones de mayor tamaño, que no están presentes normalmente en los medios extra o intracelular, y a los cuales los canales iónicos son prácticamente impermeables. Otro método de separación de las corrientes iónicas consiste en bloquear selectivamente la actividad de los canales no deseados, y para ello se cuenta con un amplio repertorio de drogas y toxinas.

Volviendo a principios de los cincuenta, Hodgkin y Huxley confirmaron que la fase de ascenso del potencial de acción en el axón gigante del calamar está acompañado de un incremento en la permeabilidad de la membrana a iones sodio, y demostraron que la fase de repolarización y de postpotencial obedece al aumento de la permeabilidad a potasio. Además, Hodgkin y Huxley describieron con gran detalle las propiedades cinéticas de las vías de permeabilidad a sodio y a potasio involucradas en tales fenómenos. En años subsecuentes, la técnica de fijación de voltaje fue perfeccionada y aplicada conjuntamente con técnicas convencionales de registro intracelular de  $E_M$  en diferentes preparaciones celulares, lo que permitió reproducir y extender el estudio de Hodgkin y Huxley a otras células excitables.

En los cincuenta, por otra parte, Paul Fatt y Bernard Katz descubrieron que en las células musculares "esqueléticas" de un cangrejo, la fase de ascenso del potencial de acción no se debe a un aumento en la permeabilidad de la membrana a iones sodio, sino a calcio. Este hallazgo fue posteriormente confirmado en una gran variedad de células de invertebrados y de vertebrados por Susuma Hagiwara y sus colaboradores. De tal manera que a finales de los sesenta ya se tenía una buena idea de los cambios de permeabilidad a iones sodio, calcio y potasio que ocurren en la membrana plasmática de diversas células neuronales, receptores sensoriales y células musculares durante la generación y conducción de potenciales de acción.

El concepto de canal iónico surgió hasta a finales de los sesenta y principios de los setenta, en gran parte debido a los trabajos de Clay Armstrong, Bertil Hille, John Moore y Toshio Narahashi. Estos investigadores, conjuntamente con sus respectivos colaboradores, demostraron que las vías de permeabilidad a los diferentes iones son entidades discretas e independientes en la membrana plasmática, que pueden ser afectadas en forma selectiva y específica por varios agentes farmacológi-

cos. Por ejemplo, se encontró que la tetrodotoxina (TTX), el principio activo del poderoso veneno del pez globo (o botete, como lo llaman los pescadores del noroeste de México), bloquea a los canales de sodio sin afectar a los canales de potasio, mientras que los iones tetraetilamonio (TEA) tienen el efecto opuesto.

Por la misma época, Armstrong propuso la primera imagen "topológica" de un canal iónico, la del canal de potasio en el axón gigante del calamar, en base a las propiedades del bloqueo con el TEA y sus derivados, aplicados intracelularmente. La propuesta de Armstrong fue que en la cara citoplásmica del canal hay una compuerta cuya posición determina si la vía de permeabilidad a potasio está cerrada o abierta; después (moviéndonos hacia el lado extracelular) existe una boca interna o vestíbulo de aproximadamente 1 nm de diámetro, cuyas paredes son hidrofóbicas, y que constituye el receptor al TEA; el vestíbulo comunica a un túnel de forma cilíndrica, que conduce al medio extracelular, y que es muy estrecho (alrededor de 0.3 nm de diámetro), de tal manera que permite el paso de iones potasio y rubidio, pero no de TEA ni de cesio. Además, en virtud de que la unión del TEA al vestíbulo no es influenciada directamente por el voltaje transmembranal, Armstrong concluyó que el campo eléctrico en la membrana tampoco controla en forma directa la posición de la compuerta. Esta tendría que ser controlada remotamente por un sensor de voltaje inmerso en la membrana, y localizado, por lo tanto, en otra región del canal. Estos conceptos fueron revolucionarios y sirvieron, entre muchas otras cosas, a manera de guía para el análisis de los efectos de otros agentes farmacológicos sobre los canales iónicos, incluyendo el de las acciones de los anestésicos locales sobre los canales de sodio.

A principios de los setenta, Armstrong y los investigadores chilenos Francisco Bezanilla y Eduardo Rojas descubrieron que la aplicación intracelular de enzimas proteolíticas destruye en forma selectiva el mecanismo de inactivación de los canales de sodio (véase más adelante), lo cual dió un fuerte apoyo a la idea de que los canales (de sodio) eran proteínas de la membrana. También en los setenta, Armstrong y Bezanilla, por un lado, y Richard Keynes y Rojas, por otro, tuvieron éxito en registrar por primera vez las corrientes de compuerta asociadas con la activación de los canales de sodio. Las corrientes de





compuerta son corrientes eléctricas microscópicas que se originan por el movimiento intramembranal de los sensores de voltaje de los canales iónicos, cuando éstos responden a los cambios en el voltaje transmembranal. El estudio de tales corrientes de compuerta requirió de la digitalización de los registros de corrientes iónicas, y marca el inicio del uso de sistemas sofisticados de cómputo para la captura y el análisis de los datos electrofisiológicos relacionados con el funcionamiento de canales iónicos. La investigación de las propiedades de las corrientes de compuerta resultó en un avance considerable del conocimiento de la cinética de apertura y cierre de los canales de sodio.

Paralelamente, Hille y sus colaboradores realizaron cuidadosos estudios, hoy clásicos, en el nodo de Ranvier de axones mielínicos de vertebrados, acerca del mecanismo de paso de iones sodio y potasio a través de sus respectivos canales iónicos. Estos estudios establecieron conceptos muy importantes en relación a la selectividad de los canales a iones, y permitieron estimar las dimensiones mínimas de los poros iónicos en el interior de los canales.

Igualmente en los setenta, Noble, Reuter, Tsien y sus respectivos colaboradores, trabajando en miocitos cardíacos, demostraron que los canales de calcio y de potasio son susceptibles de ser modulados por agonistas beta-adrenérgicos así como por acetilcolina, y que esta modulación involucra la participación de nucleótidos cíclicos intracelulares. Lo anterior abrió un nuevo y amplio campo de investigación, el de la modulación de los canales iónicos dependientes del voltaje por hormonas y neurotransmisores.

Por otra parte, Ritchie y sus colaboradores, así como otros investigadores, lograron estimar la densidad de canales de sodio en la membrana, midiendo la unión de moléculas de TTX radioactivas (o de saxitoxina, otra toxina natural que se une selectivamente a los canales de sodio). De esa manera sabemos que en el axón gigante del calamar existen de 200 a 500 canales de sodio por micrómetro cuadrado de membrana. La disponibilidad de estas toxinas en su forma radioactiva permitió también seguir a las macromoléculas asociadas al canal de sodio durante procedimientos bioquímicos de purificación de proteínas. De esa manera se llegó a la conclusión de que el canal de sodio, proveniente de diversos tejidos, es una glucoproteína con un peso molecular cercano a 300 kd, y de que aproximadamente 30% de su masa son carbohidratos asociados a la proteína.

A finales de los setenta y principios de los ochenta se consiguieron dos importantes avances metodológicos en el estudio de los canales iónicos: el desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de registro electrofisiológico en microáreas de membrana ("patch clamp"), por Erwin Neher, Bert Sackman y otros, y la introducción de las técnicas de biología molecular para la clonación y secuenciación del DNA complementario (DNAC), por Shosaku Numa y sus numerosos colaboradores.

Las técnicas de patch clamp se basan en la formación de un sello de alta resistencia eléctrica entre la punta de un microelectrodo de vidrio y la membrana. El diámetro de la punta del electrodo es 0.5-3  $\mu\text{m}$ . La solución salina en el interior del microelectrodo es conectada a la entrada inversora de un amplificador operacional que funciona como transductor corriente-voltaje (figura 3A). La entrada no inversora de este amplificador recibe un pulso comando de voltaje, con lo cual es posible controlar el potencial eléctrico en el interior del microelectrodo, así como registrar las corrientes asociadas con el

funcionamiento de los canales en la membrana que está en continuidad eléctrica con el microelectrodo. Existen varias configuraciones o variantes de patch clamp, mediante las cuales se puede registrar la actividad de canales iónicos individuales en microdominios de la membrana, o alternativamente, también se puede registrar la actividad del conjunto de canales iónicos en la membrana completa de células pequeñas, como se ilustra en la figura 3B.

Estas nuevas técnicas de registro electrofisiológico brindaron la posibilidad de extender los estudios de canales iónicos a una variedad enorme de tipos celulares neuronales, musculares, epiteliales, glandulares, y sanguíneos, entre otros, los cuales habían resistido la exploración electrofisiológica por su pequeño tamaño. Las técnicas de patch clamp además hicieron posible el estudio de las corrientes iónicas unitarias (o "microscópicas") que fluyen a través de un solo canal abierto. La amplitud de la corriente unitaria es hoy un parámetro importante en la identificación y caracterización de un canal iónico dado.

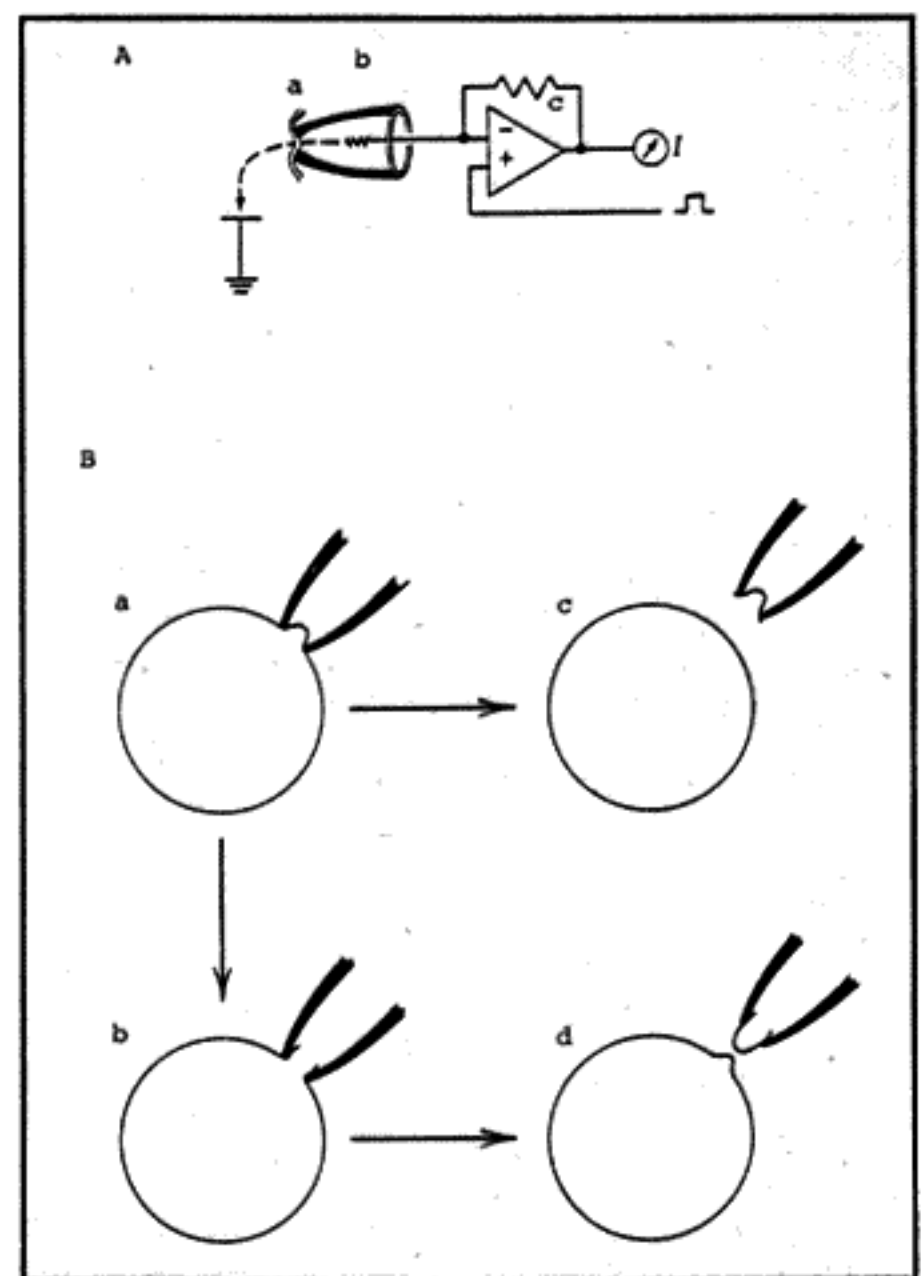


Figura 3. Técnicas de "patch clamp". A) Condición general de registro (véase el texto). a, membrana; b, electrodo; c, transductor corriente-voltaje. B) Cuatro de las configuraciones o variantes de patch clamp. a, registro de una microárea de membrana que permanece unida a la célula original. A partir de esta configuración es posible obtener las siguientes otras variantes; b, registro de la superficie membranal completa. La región de la membrana limitada por la apertura en la punta del electrodo ha sido destruida, con lo cual el medio intracelular queda en continuidad eléctrica con el interior del electrodo; c y d, registro de microáreas de membrana aisladas de la célula. La superficie intracelular de la microárea de membrana queda expuesta a la solución extracelular de registro (c), o a la contenida en el electrodo (d).



vidad de otros canales iónicos distintos a los de calcio. Por ejemplo, la estimulación de la actividad de los canales de potasio frecuentemente da como resultado la hiperpolarización de la membrana, lo que ocasiona que disminuya la actividad de los canales de calcio dependientes del voltaje, y esto a su vez puede resultar en la disminución de la concentración de calcio en el citoplasma. Además, en las células musculares, el potencial de acción en la membrana plasmática (o en las invaginaciones de la misma) induce la liberación de calcio de reservorios intracelulares. La posibilidad de que mecanismos similares a este último también operen en otras células excitables, incluyendo a las neuronas, es tema de intensa investigación en este momento.

**Canales de potasio.** Los canales de potasio participan en el mantenimiento del potencial de reposo, y contribuyen a generar las fases de repolarización y postpotencial de los potenciales de acción, así como a regular el disparo repetitivo de los mismos. Posiblemente también participan en la regulación de la osmolaridad intracelular y volumen de las células.

Al igual que en el caso de los canales de calcio, las neuronas expresan múltiples tipos de canales de potasio. De hecho, la diversidad de canales de potasio es mucho mayor que la de cualquier otro tipo de canal iónico conocido, y se sabe de la existencia de varias decenas de subtipos diferentes de canales de potasio entre las distintas clases de neuronas y otras células animales que han sido estudiadas. Dentro de ese conjunto enorme de canales se pueden distinguir cuatro grandes grupos: a) Canales de inactivación lenta (o canales rectificadores tardíos); b) Canales de inactivación rápida (o canales tipo A); c) Canales que se pueden abrir al potencial de membrana reposo, y d) Canales dependientes de calcio intracelular.

Los de inactivación lenta se asemejan en sus propiedades cinéticas a las del principal canal de potasio presente en el axón gigante del calamar, que frecuentemente se denomina rectificador tardío. Una de las principales funciones de este grupo de canales de potasio es la de repolarizar rápidamente a la membrana durante el potencial de acción. Los canales tipo A, por otra parte, son canales que dan lugar a corrientes transitorias similares en curso temporal, pero no tan rápidas, a las generadas por la actividad de los canales de sodio, y que resultan particularmente relevantes en la modulación de la frecuencia de disparo durante trenes de potenciales de acción. Además del curso temporal de inactivación, otras diferencias cinéticas y farmacológicas

permiten distinguir entre los miembros de estos dos primeros grupos de canales de potasio.

Por su parte, la actividad de los canales de potasio abiertos en reposo es la que le da a la membrana neuronal en reposo su característica permeabilidad a iones potasio, que es alta en comparación con la permeabilidad a otros iones, determinando que el potencial de membrana en esa condición tenga un valor negativo cercano a  $E_K$ . Existen varios subtipos dentro de este grupo de canales, entre ellos los canales que dan lugar al fenómeno denominado rectificación entrante o anómala. Este fenómeno, descubierto por Bernard Katz en el músculo esquelético en 1949, consiste en la disminución de la permeabilidad de la membrana en respuesta a la despolarización, y obedece al cierre de canales de potasio. Más específicamente, los canales rectificadores anómalos permiten el paso de iones potasio hacia adentro de la célula (tal como ocurre a potenciales de membrana más negativos que  $E_K$ ) pero no la salida de los mismos (durante una despolarización, por ejemplo).

Carol Vandenberg ha demostrado recientemente que esta curiosa propiedad depende del bloqueo de los canales por magnesio intracelular, que actúa tanto de sensor de voltaje, como de compuerta extrínseca al canal.

Otros ejemplos de canales de potasio abiertos en reposo son los denominados canales M y los canales S. Los primeros pueden estar abiertos a  $-50$  mV, su activación es lenta, no se inactivan, y son bloqueados por agonistas de receptores colinérgicos muscarínicos (de aquí el nombre de M), posiblemente como resultado de la acción de mensajeros químicos intracelulares. Los canales M han sido estudiados extensivamente por Paul Adams y sus colaboradores en neuronas de los ganglios simpáticos de vertebrados, donde participan (al ser bloqueados) en la generación de potenciales sinápticos que son lentos y excitatorios. Los S son canales presentes en las neuronas de *Aplysia*, que en algunos aspectos resultan análogos a los canales M de las neuronas de vertebrados, pero que tienen una dependencia al voltaje muy débil. Eric Kandel y sus colaboradores han mostrado que la actividad de los canales S es inhibida por serotonina, lo cual induce un potencial sináptico lento excitatorio en las neuronas mencionadas. Tal acción de la serotonina parece estar mediada por el monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) en el medio intracelular.

El cuarto grupo de canales de potasio, los dependientes de calcio, está presente en la mayoría de las células que han sido estudiadas con técnicas electrofisiológicas. Se trata de canales dependientes del voltaje, pues son abiertos en respuesta a la despolarización, pero además la sensibilidad al voltaje se ve grandemente aumentada cuando se elevan los niveles intracelulares de calcio. En algunas células, el funcionamiento de los canales de potasio dependientes de calcio hace posible la actividad eléctrica "en salvas", que consiste en períodos de disparo repetitivo de potenciales de acción, separados por períodos sin potenciales de acción. Tal tipo de actividad eléctrica parece ser de considerable importancia en el control de la actividad secretora de diversas células exocrinas y endocrinas. Precisamente, fue en las células cromafines (secretoras de catecolaminas) que Alan Marty registró y caracterizó por vez primera las corrientes unitarias a través de un tipo de canal de potasio dependiente de calcio, el ahora denominado BK o maxi K. La conductancia unitaria de los BK es muy grande, 200 a 300 pS en la presencia de concentraciones altas de potasio a cada lado de la membrana. El chileno Ramon Latorre y sus colaboradores han llevado a cabo estudios extensos de las propiedades funcionales de los canales BK, purificándolos de la membrana



de los túbulos transversos del músculo esquelético de mamíferos e incorporándolos en membranas artificiales.

Más recientemente, Blatz y Magleby han descubierto que las células musculares esqueléticas en cultivo expresan dos tipos de canales de potasio dependientes de calcio. Además de los BK, encontraron otros canales con una conductancia unitaria mucho menor (10-14 pS), y de mayor sensibilidad al calcio intracelular, a los que denominaron canales SK (o mini K). La actividad de los canales SK genera la hiperpolarización de larga duración que se observa en los miocitos después de un potencial de acción, lo cual es imprescindible para el disparo repetitivo durante períodos prolongados. Al igual que muchos otros tipos de canales de potasio, los canales BK son bloqueados por el TEA aplicado extracelularmente. Por el contrario, los canales SK son resistentes al TEA, y sensibles a la apamina, una toxina del veneno de la abeja. La apamina no afecta a los canales BK.

Es interesante señalar que la expresión de los canales SK por los miocitos en cultivo puede ser regulada por la innervación de las células musculares: los canales desaparecen cuando las células son innervadas, y aparecen al desnervar el músculo esquelético. Los canales SK probablemente corresponden a los receptores a la apamina encontrados en la membrana de células musculares esqueléticas provenientes de pacientes con distrofia muscular miotónica, en la cual el potencial de reposo de las células musculares está reducido en magnitud y se observan trenes de potenciales de acción, tal como sucede en los miocitos cultivados.

#### AVANCES RECIENTES EN EL ESTUDIO DE LOS CANALES DE SODIO

Esta sección brinda información más detallada acerca del funcionamiento de los canales de sodio y resume algunos de los avances recientes en el estudio de los mismos, con el fin de ilustrar el tipo de investigaciones que se están llevando actualmente a cabo sobre la función y estructura de los canales dependientes del voltaje.

**Propiedades cinéticas.** Los canales de sodio se encuentran en el estado cerrado al potencial de reposo en la mayoría de las células excitables, y se abren (conducen iones) en forma transitoria en respuesta a una despolarización sostenida. Esta propiedad fue por primera vez descrita en el axón gigante del calamar por Hodgkin y Huxley, y ha sido el tema de numerosas investigaciones, tanto en el axón gigante como en muchas otras membranas biológicas.

Los registros en la figura 4 representan corrientes de sodio en células neuroendócrinas de la pars intermedia de la adenohipófisis, las cuales sintetizan y secretan varios péptidos bioactivos de la familia de las melanotropinas y endorfinas. Estos registros ilustran varias de las propiedades generales de los canales de sodio. En el registro A de la figura 4, se aplicó un pulso despolarizante a 0 mV, a partir de un potencial de mantenimiento (el potencial de reposo impuesto experimentalmente a la célula) de -80 mV. Los canales de sodio se abren rápidamente en respuesta a la despolarización de la membrana, fluyendo sodio al interior de la célula. La corriente entrante de sodio aumenta con un curso temporal que se asemeja a una sigmoide. Se puede observar además que el proceso de apertura (o activación) de los canales es reversible, pues cuando el pulso despolarizante termina y la membrana es repolarizada a -80 mV, los canales se vuelven a cerrar.

El cierre (o desactivación) de los canales de sodio en res-

puesta a la repolarización es rápido, pero no instantáneo, lo cual permite que los iones sodio sigan entrando a la célula aún después de la terminación del pulso despolarizante. De hecho, como consecuencia de la repolarización a -80 mV la fuerza impulsora para la entrada de sodio aumenta drásticamente, resultando en un marcado incremento en el número de iones sodio que entran a la célula por cada canal abierto. La corriente así generada se denomina "cola". La amplitud de la cola de corriente de sodio disminuye con el tiempo conforme los canales se cierran.

En el registro B de la figura 4 se ilustra lo que sucede si el pulso despolarizante es prolongado durante más tiempo. Se puede observar que después de alcanzar un valor máximo, la corriente de sodio tiende a disminuir gradualmente durante la misma despolarización, hasta que deja de ser detectable. La explicación es que los canales abiertos en respuesta a la despolarización se vuelven a cerrar después de un cierto tiempo,

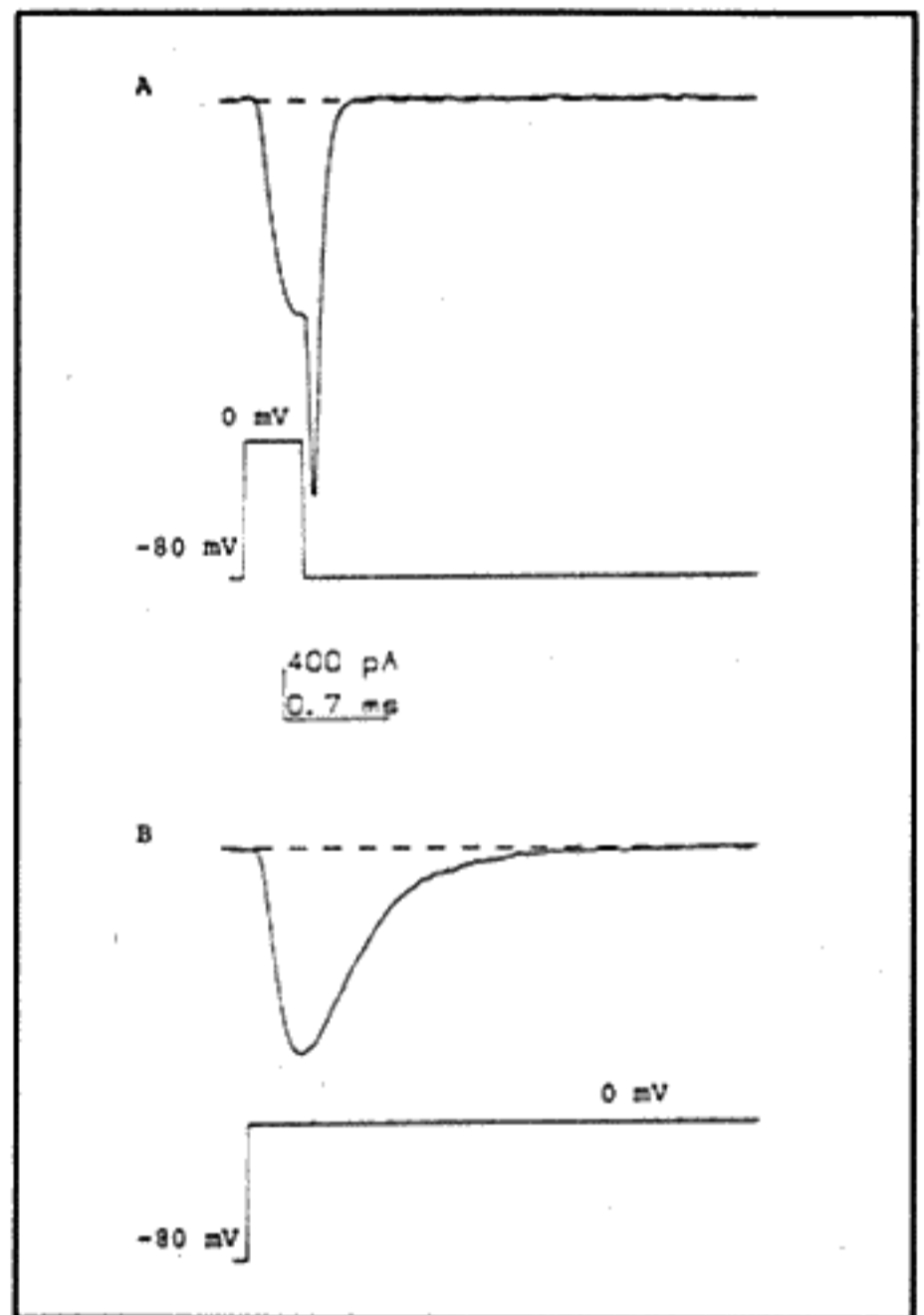


Figura 4. Actividad funcional de los canales de sodio. El trazo superior en cada par de registros corresponde a la corriente eléctrica transportada por iones sodio a través de canales selectivos a esos iones, presentes en la membrana plasmática de una célula neuroendócrina, mantenida en cultivo, de la pars intermedia de la adenohipófisis de la rata. A) Corriente de sodio asociada con la apertura (activación) y cierre (desactivación) de los canales, en respuesta a la despolarización y repolarización de la membrana, respectivamente. B) Corriente de sodio durante una despolarización sostenida durante varios milisegundos, que muestra el fenómeno de inactivación de los canales. Los registros fueron obtenidos a 21°C bajo control de voltaje, mediante la configuración de la célula completa de la técnica de patch clamp. El potencial de equilibrio para sodio fue +48 mV.



aunque persista la despolarización. Al mecanismo de cierre implicado en este caso se le conoce como inactivación. El estado inactivado es distinto del estado cerrado de reposo: de este último el canal puede ser abierto rápidamente por despolarización, mientras que en el primer caso el canal no está disponible para ser abierto por la misma maniobra. Para que el canal pase del estado cerrado inactivado al estado cerrado de reposo se requiere repolarizar la membrana durante varios segundos a un potencial suficientemente negativo. Incluso se puede demostrar que al aplicar una despolarización, algunos canales de sodio cerrados en reposo pasan al estado cerrado inactivado, sin llegar a conducir iones en ningún momento.

La inactivación de los canales de sodio es de gran relevancia para el señalamiento eléctrico neuronal, pues además de favorecer la repolarización del potencial de acción, contribuye también al período refractario que sigue al potencial de acción, período durante el cual la neurona no es capaz de producir nuevos potenciales de acción, y condiciona la frecuencia máxima de disparo en células capaces de producir trenes de potenciales de acción. Por lo anterior, la inactivación de los canales de sodio ha sido investigada en extenso, y ya se empiezan a conocer los detalles del mecanismo molecular involucrado.

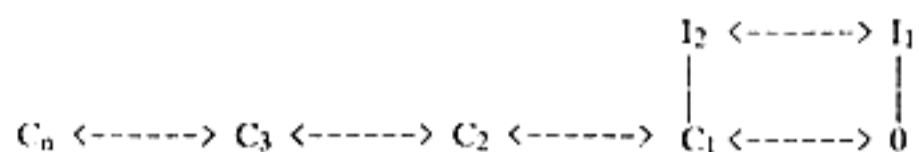
Hodgkin y Huxley fueron también los primeros en modelar la conducta cinética de los canales de sodio. Su modelo supone que la apertura y cierre de cada canal está gobernada por la posición de dos compuertas dependientes del voltaje e independientes entre sí: compuertas de activación e inactivación. El canal conduce iones cuando ambas compuertas están abiertas. En el estado cerrado de reposo sólo la compuerta de activación está cerrada, mientras que en el estado cerrado inactivado la compuerta de inactivación es la que lo está. En este modelo, el movimiento de una compuerta es completamente independiente del movimiento de la otra. El hallazgo de que algunas enzimas proteolíticas destruyen selectivamente al proceso de inactivación de los canales de sodio cuando son aplicadas intracelularmente, brindó apoyo experimental a la idea de que la activación e inactivación de los canales son procesos separables, y sugirió que la compuerta de inactivación está en la cara intracelular del canal.

El modelo de Hodgkin y Huxley, sin embargo, no ha resistido el paso del tiempo. Por ejemplo, se sabe ahora que la activación e inactivación de los canales de sodio, aunque son procesos separables, no son independientes entre sí. Más concretamente, el análisis de las corrientes de compuerta llevado a cabo por Armstrong y sus colaboradores en el axón gigante del calamar, y el de las corrientes unitarias por Charles Stevens y sus asociados en neuronas de mamíferos, indican que: a) un canal de sodio se puede inactivar sólo si se encuentra activado previamente, al menos en forma parcial; b) un canal no puede desactivarse por completo, es decir, regresar al estado cerrado de reposo, si está todavía inactivado, y c) la transición del estado abierto al inactivado no es dependiente del voltaje.

La dependencia al voltaje del proceso de inactivación es sólo aparente y la adquiere del mecanismo de activación. Recientemente, Armstrong y el autor de este artículo han ofrecido evidencia experimental que apoya fuertemente a la aseveración anterior. Lo que hicimos fue analizar con detalle el curso temporal con que se cierran los canales de sodio a diferentes valores de  $E_M$ . Un canal de sodio abierto puede cerrarse por desactivación o por inactivación, y para distinguir entre esos dos mecanismos utilizamos a la papaína, una enzima proteolítica que cuando es aplicada intracelularmente destruye el

mecanismo de inactivación. Encontramos que a potenciales de membrana más positivos que  $-20$  mV, los canales de sodio abiertos se cierran casi exclusivamente por inactivación, y lo hacen con un curso temporal que no depende del voltaje.

El comportamiento cinético de los canales iónicos es representado con frecuencia mediante diagramas de estado, y el siguiente describe las principales propiedades cinéticas de los canales de sodio:



Las C's corresponden a diferentes estados cerrados del canal, mientras que O representa el estado abierto.  $I_1$  e  $I_2$  son los estados cerrados inactivados.

A un potencial de reposo de  $-80$  mV la mayoría de los canales están en el estado  $C_n$ . La despolarización favorece la activación del canal, lo que implica que transite desde el estado  $C_n$  hacia el estado O. Para abrirse el canal tiene que pasar por varios estados cerrados intermedios, y esta característica explica el curso temporal sigmoide con el que se activa la corriente de sodio que fluye a través de una población de canales (figura 4A). La repolarización de la membrana tiene el efecto opuesto, pues favorece las transiciones hacia  $C_n$  (desactivación). El canal se puede cerrar aunque persista la despolarización, mediante el proceso de inactivación, ya sea desde el estado abierto, después de haber conducido iones durante un cierto tiempo, o directamente desde el estado  $C_1$ , antes de haberse activado por completo.

La inactivación se visualiza como el bloqueo del canal, parcial o totalmente activado, por una "partícula" inactivante unida a la cara intracelular del canal, y que es muy sensible al ataque proteolítico por enzimas. El movimiento de tal partícula inactivante, así como su interacción con el canal para bloquearlo (transición  $C_1 \rightarrow I_2$ , ó  $O \rightarrow I_1$ ), se realiza fuera del campo eléctrico transmembranal.

**Biología molecular.** Numa y sus colaboradores han deducido la estructura primaria (es decir, la secuencia de aminoácidos) de tres tipos de canal de sodio, uno del órgano eléctrico de la anguila *Electrophorus electricus* y otros dos provenientes del cerebro de rata, mediante la clonación y secuenciación del ADN complementario (ADNc) a los ARN mensajeros (ARNm) que codifican para la proteína de los canales. Estos estudios muestran que la secuencia de aminoácidos del canal de sodio ha sido conservada en gran parte durante un largo período evolutivo. El conocimiento de la estructura primaria, ha conducido al planteamiento de modelos tentativos para las estructuras secundaria y terciaria del canal. El modelo propuesto por Numa y sus colaboradores se muestra en la figura 5, y se describe con algún detalle a continuación.

El canal de sodio de la anguila está constituido por un polipéptido de 1820 residuos de aminoácidos, con un peso molecular cercano a 260 kd, y está fuertemente glucosilado (unión de carbohidratos a la cadena polipeptídica). En el polipéptido se pueden distinguir cuatro grandes dominios o unidades con una alta homología entre sí. La cadena polipeptídica de cada dominio se pliega dando lugar a seis diferentes segmentos, constituidos por hélices alfa, que atraviezan completamente a la membrana, desde la cara intracelular a la extracelu-

lar (figura 5A). Ambos grupos terminales, amino y carboxilo, están del lado citoplásmico.

La mayor parte de todos los segmentos se encuentra inmersa en la bicapa lipídica. Los cuatro conjuntos de segmentos transmembranales están agrupados uno al lado de otro, formando una estructura cilíndrica, en donde el diámetro de la base es mayor que la altura. El centro del cilindro es un túnel de paredes hidrofílicas, la vía de permeabilidad a iones. La región periférica del cilindro (la que entra en contacto con los lípidos de la membrana) está formada por los segmentos más apolares, los S5 y S6. La región central, aquella que constituye las paredes del poro iónico, está formada por los segmentos S2. Los segmentos S1, S3 y S4 se localizan entre los dos anteriores conjuntos (figura 5B). Los segmentos S2 contienen residuos de aminoácidos con grupos cargados negativamente, que están muy conservados entre los diferentes tipos de canales de sodio que han sido secuenciados, y que podrían contribuir a la selectividad del canal por iones sodio.

En el canal en reposo el poro iónico está permanentemente abierto, a excepción de su extremo citoplásmico que está cerrado, posiblemente por las regiones del polipéptido localizadas en el extremo de algunos de los segmentos. Los segmentos S4 poseen un gran número de residuos de aminoácidos (arginina y lisina) con carga positiva, dispuestos en forma de espiral a lo largo de la superficie del segmento. Las cargas positivas en S4 interaccionarían con cargas negativas, dispuestas de manera complementaria, en los segmentos vecinos S1 y S3. Estos dos grupos de carga podrían ser los sensores de voltaje que permiten que el canal responda a los cambios en el potencial de membrana.

La activación del canal en respuesta a la despolarización podría involucrar que cada segmento S4 realice un movimiento de rotación alrededor de su eje, avanzando durante tal movimiento hacia la superficie extracelular, mientras que simultá-

neamente los segmentos vecinos se moverían en el sentido contrario. Según Robert Guy, este movimiento sería semejante al que efectúa un tornillo cuando se introduce en un agujero con la cuerda adecuada, y daría como resultado cambios conformacionales que eliminarían la obstrucción del poro iónico en su extremo citoplásmico, quedando así libre el paso para el flujo transmembranal de iones.

Este y otros modelos estructurales del canal de sodio están siendo actualmente puestos a prueba, utilizándose diversos enfoques experimentales. Así, un enfoque es el de mutagénesis puntual dirigida, que utiliza métodos de ingeniería genética para modificar en forma selectiva y precisa la secuencia de bases en el ADN que codifica para el canal. Moléculas de ARN mensajero, producto de la transcripción *in vitro* del ADN modificado, son entonces introducidas en el interior de células huésped (ovocitos de *Xenopus*, generalmente), que sintetizan e insertan en su membrana plasmática a los canales mutantes. Las consecuencias funcionales de la mutación son luego analizadas con detalle.

Otro enfoque es el de los grupos de Robert Barchi y William Catterall, quienes están desarrollando e investigando el efecto sobre canales normales, de anticuerpos capaces de reconocer regiones específicas en la cadena de aminoácidos del canal. Un tercer y poderoso enfoque es el de ingeniería de proteínas, aplicado recientemente por Mauricio Montal y sus colaboradores, y que consiste básicamente en el diseño y síntesis *in vitro* de péptidos con secuencias de aminoácidos que mimetizan las de los diferentes segmentos del canal, por ejemplo las de aquellos que supuestamente conforman al poro iónico. Los péptidos sintéticos son posteriormente incorporados en bicapas lipídicas artificiales para investigar sus propiedades funcionales, comparándolas con las del canal auténtico completo.

Cada uno de estos enfoques, o combinaciones de ellos, están permitiendo avanzar rápidamente en el conocimiento de la relación entre la estructura y la función del canal de sodio, a un nivel molecular. Por ejemplo, en experimentos de mutagénesis puntual dirigida, Walter Stuhmer en colaboración con el grupo de Numa, ha encontrado evidencia que apoya la idea de que las cargas positivas en los segmentos S4 forman parte de los sensores de voltaje, y de que la región citoplásmica del polipéptido que conecta al dominio III con el dominio IV constituye parte de la partícula inactivante.

**Diversidad.** Las propiedades fundamentales de los canales de sodio han sido altamente conservadas a lo largo de la escala filogenética. Aún así, se puede hablar de diferentes tipos de canales de sodio en base a diferencias en sus propiedades cinéticas, sensibilidad a la acción bloqueante de la TTX, conductancia unitaria, y estructura primaria. Es posible incluso distinguir tipos diferentes de canales de sodio aún en un mismo tipo celular de un organismo dado. Por ejemplo, los canales de sodio de las neuronas y células musculares provenientes de ratas adultas suelen ser bloqueados por concentraciones nanomolares de TTX, mientras que los canales de las células provenientes de embriones son mucho menos sensibles al bloqueo por la toxina.

Siguiendo con este tópico, la desnervación del músculo esquelético en el animal adulto induce la síntesis de canales de sodio resistentes a la TTX, al mismo tiempo que disminuye la densidad en la membrana plasmática de los canales sensibles a la toxina y que están normalmente presentes. Ambos tipos de canales, sensibles y resistentes a la TTX, son simultáneamente expresados por células musculares cardíacas adultas. Richard Weiss y Richard Horn han encontrado en los mioblastos que

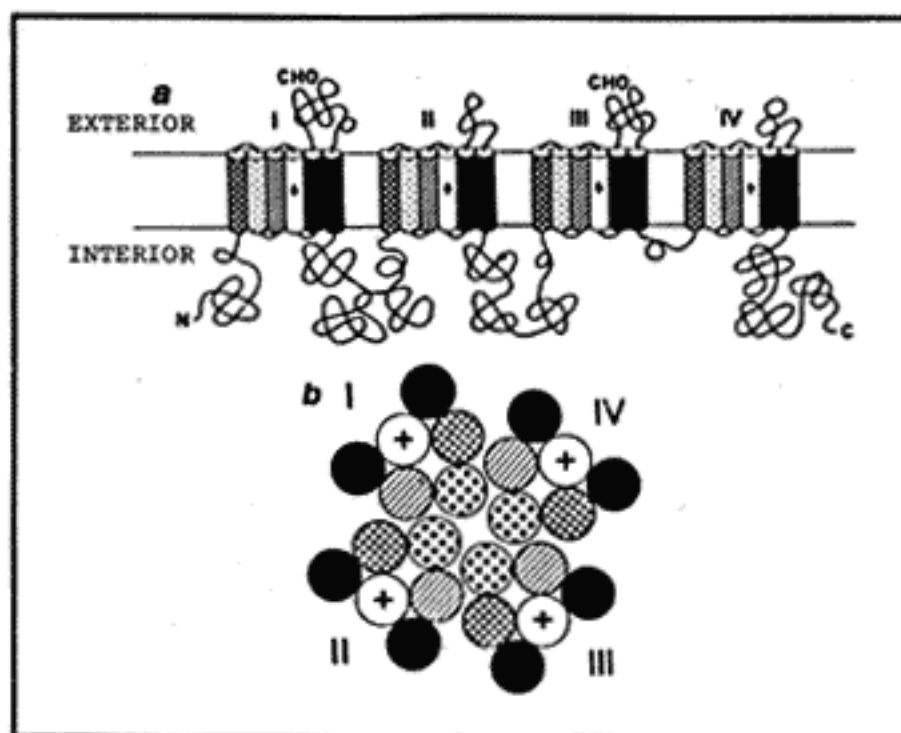


Figura 5. Modelo molecular propuesto por Numa y sus colaboradores para el canal de sodio. a) El canal es un polipéptido con cuatro dominios o unidades (I-IV) muy parecidos entre sí. Cada dominio está constituido por seis helices alfa transmembranales o segmentos (S1-S6). Los segmentos están indicados por cilindros de la manera siguiente: S1, con trazo cuadrículado; S2, con punteado; S3, con líneas diagonales; S4, con un signo positivo; S5 y S6, en negro. CHO indica los sitios que estarían glucosilados. b) Distribución espacial de los dominios y segmentos en el canal, visto en la dirección perpendicular al plano de la membrana.



los canales menos sensibles a la TTX son activados a potenciales de membrana más negativos y sus corrientes unitarias son de menor amplitud que lo observado para los canales que son bloqueados por pequeñas concentraciones de TTX.

En relación con esta variabilidad en las propiedades de los canales de sodio, conviene también señalar que los canales de sodio de neuronas y células musculares de mamíferos están compuestos por dos o tres subunidades: una subunidad grande, muy similar al único polipéptido del canal de sodio del órgano eléctrico de la anguila, denominada subunidad alfa, y una o dos subunidades pequeñas, denominadas beta, de peso molecular entre 30 y 40 kd. En el canal maduro, aquél presente en la membrana plasmática, al menos una de las subunidades beta está unida covalentemente a la subunidad alfa por enlaces disulfuro. Además, Numa y sus colaboradores han obtenido la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa para dos tipos de canales de sodio provenientes del cerebro de la rata, a los que denominan tipo I y tipo II. Estos difieren entre sí en sus estructuras primarias, y posiblemente también en sus propiedades funcionales. No está claro si una misma neurona es capaz de expresar ambos tipos (I y II) de canales o si provienen de tipos celulares diferentes.

**Biología celular.** Durante la presente década ha sido posible obtener información relacionada con el metabolismo de los canales de sodio. Así, en las células de neuroblastoma, una preparación muy utilizada en este tipo de estudios, Catterall y sus colaboradores han mostrado que la vida media de un canal en la membrana plasmática es de aproximadamente 26 horas. Ya que el número total de canales en la membrana plasmática de cada célula de neuroblastoma es cercano a 50 000, en promedio, estas células degradan y reemplazan en la membrana cerca de 1 000 canales por hora.

En otra preparación, la de los cuerpos neuronales que dan lugar a los axones que al fundirse entre sí forman los axones gigantes del calamar (neuronas GLF.) William Gilly y sus colaboradores han encontrado que el número promedio de canales de sodio por neurona es de aproximadamente 200 000 (alrededor de 37 canales por micrómetro cuadrado de membrana). A partir de este dato y del curso temporal con el cual los canales desaparecen cuando las neuronas GLF son tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas, se estima que estas células sintetizan alrededor de 7 000 canales de sodio por hora. Estas cifras dan idea de lo extraordinariamente dinámica que puede llegar a ser una población de canales iónicos.

Otros datos relacionados con el metabolismo de los canales de sodio son que en las células neuronales provenientes del cerebro de embriones o de ratas recién nacidas, cerca del 70% del total de subunidades alfa en una célula están localizados intracelularmente, no en la membrana plasmática. Es preciso subrayar que esto ocurre en las neuronas inmaduras, en las cuales la síntesis de nueva membrana es muy activa. En las neuronas del cerebro adulto, mucho menos activo en la síntesis de nueva membrana neuronal, las subunidades alfa intrace-

lulares no son un componente prominente. Tales subunidades alfa intracelulares podrían entonces funcionar como reservorio de canales de sodio presintetizados, listos para ser incorporados a la membrana plasmática durante períodos de intensa biogénesis de membrana.

Resulta interesante que a diferencia de lo que se observa en el canal maduro, las subunidades alfa intracelulares no están unidas covalentemente a las subunidades beta. Catterall y sus colaboradores proponen que tal ensamblaje de subunidades podría ser un paso crucial en la maduración intracelular del canal, determinando, por ejemplo, el momento de la incorporación del canal a la membrana plasmática. A propósito, las subunidades alfa libres están ya glucosiladas y unidas a membranas intracelulares. Esto es de interés por que el mantenimiento de los niveles normales de canales funcionales de sodio en la membrana plasmática de las células de neuroblastoma requiere de la glucosilación intracelular de las subunidades alfa.

Los mecanismos que regulan la rapidez de síntesis *in vivo* de los canales de sodio no están todavía bien entendidos. Sin embargo, algunas respuestas a preguntas relacionadas con tales mecanismos han sido aportadas por estudios recientes en las células PC12, una línea celular derivada de la glándula suprarrenal, y en células musculares esqueléticas en cultivo. Las células PC12 pueden generar potenciales de acción sólo si el medio en el que son mantenidas en cultivo contiene al factor de crecimiento neural (NGF).

La excitabilidad eléctrica de las células PC12 tratadas con NGF está relacionada con un gran incremento en la densidad de canales de sodio en la membrana plasmática, como consecuencia del aumento en la síntesis intracelular de los canales. Más específicamente, Mandel y sus colaboradores han podido establecer que el NGF induce en las células PC12 la expresión del gene para el canal de sodio tipo II, uno de los dos tipos de canales identificados en base a la estructura primaria de la subunidad alfa en las células del cerebro de la rata.

En los miocitos, por otra parte, el grupo de Catterall ha demostrado que la actividad eléctrica de las células disminuye la densidad de canales de sodio en la membrana plasmática, posiblemente a través del incremento en los niveles de calcio libre en el citoplasma. Por el contrario, el aumento de los niveles intracelulares de PMc tiene el efecto opuesto. Las modificaciones en la densidad de canales de sodio funcionales están asociadas a cambios paralelos en los niveles intracelulares de RNAm que codifican para la subunidad alfa de los canales. No se conoce a la fecha los mecanismos involucrados en estas acciones de los iones calcio y AMPc. ■

En los miocitos, por otra parte, el grupo de Catterall ha demostrado que la actividad eléctrica de las células disminuye la densidad de canales de sodio en la membrana plasmática, posiblemente a través del incremento en los niveles de calcio libre en el citoplasma. Por el contrario, el aumento de los niveles intracelulares de PMc tiene el efecto opuesto. Las modificaciones en la densidad de canales de sodio funcionales están asociadas a cambios paralelos en los niveles intracelulares de RNAm que codifican para la subunidad alfa de los canales. No se conoce a la fecha los mecanismos involucrados en estas acciones de los iones calcio y AMPc. ■

#### RECONOCIMIENTOS

Las figuras 1 y 2 son versiones modificadas de la figura 1B del Capítulo 2 del libro de Hille (1984) y de la figura 1 del artículo



de Brown y Birnbaumer, respectivamente. La figura 3A fue adaptada de la figura 5E, Capítulo 2, de Hille 1984), y la 3B de la revisión de Corey (1983). La figura 5 se tomó de Noda *et al.* (1986). Los registros en las figuras 4 fueron obtenidos en el laboratorio del autor, con la colaboración de Angel Marín, Araceli Navarrete y Raúl González.

## BIBLIOGRAFÍA SELECTA

### GENERAL

- Brown, A. M. y L. Birnbaumer. 1988. Direct G protein gating of ion channels. *American Journal of Physiology* 254:H401-410.
- Corey, D. P. 1983. Patch clamp: current excitement in membrane physiology. *Neuroscience Commentaries* 1:99-110.
- Dunlap, K., G. G. Holz y S. G. Rane 1987. G proteins as regulators of ion channel function. *Trends in Neurosciences* 10:241-244.
- Hille, B. 1984. *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Press.
- Hille, B. 1988. Ionic channels: molecular pores of excitable membranes. *The Harvey Lectures* 82:47-69.
- Miller, C. 1987. How ion channel proteins work. En: *Neuromodulation*, L. K. Kaczmarek e I. B. Levitan. (Eds.) Oxford University Press. pp. 39-63.
- Miller, C. 1989. Genetic manipulation of ion channels: a new approach to structure and mechanism. *Neuron* 2:1195-1205.
- Sakman, B. y E. Neher. 1983. *Single-Channel Recording*. Plenum Press.
- Siegelbaum, S. A. y R. W. Tsien. 1983. Modulation of gated ion channels as a mode of transmitter action. *Trends in Neurosciences* 6:307-313.
- Stevens, Ch. F. 1984. Biophysical studies of ion channels. *Science* 225:1346-1350.
- Stevens, Ch. F. 1987. Channel families in the brain. *Nature* 328:198-199.

### ACERCA DE LOS CANALES DE SODIO

- Aldrich, R. W. y C. F. Stevens. 1987. Voltage-dependent gating of single sodium channels from mammalian neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience* 7:418-431.
- Armstrong, C. M. 1981. Sodium channels and gating currents. *Physiological Reviews* 61:644-683.
- Barchi, R. L. 1988. Probing the molecular structure of the voltage-dependent sodium channel. *Annual Review of Neuroscience* 11:455-95.
- Brismar, T. y W. F. Gilly 1987. Synthesis of sodium channels in the cell bodies of squid giant axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 84:1459-1463.
- Cota, G. y C. M. Armstrong. 1989. Sodium channel gating in clonal pituitary cells. The inactivation step is not voltage dependent. *Journal of General Physiology*. (En prensa)
- Guy, H. R. 1988. A model relating the structure of the sodium channel to its function. *Current Topics in Membranes and Transport* 33:289-308.
- Mandel, G., S. S. Cooperman, R. A. Maue, R. H. Goodman y P. Brehm. 1988. Selective induction of brain type II Na<sup>+</sup> channels by nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85:924-928.
- Noda, M. *et al.* 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- Noda, M. *et al.* 1986. Existence of distinct sodium channel messenger RNAs in rat brain. *Nature* 320:188-192.
- Offord, J. y W. A. Catterall. 1989. Electrical activity, cAMP, and cytosolic calcium regulate ARNm encoding sodium channel alpha subunits in rat muscle cells. *Neuron* 2:1447-1452.
- Oiki, S., W. Danho y M. Montal. 1988. Channel protein engineering: synthetic 22-mer peptide from the primary structure of the voltage-sensitive sodium channel forms ionic channels in lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 85:2393-2397.
- Schmidt, J., S. Rossie y W. A. Catterall. 1985. A large intracellular pool of inactive Na channel alpha subunits in developing rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 82:4847-4851.
- Stuhmer, W. *et al.* 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597-603.
- Trimmer, J. S. y W. S. Agnew. 1989. Molecular diversity of voltage-sensitive Na channels. *Annual Review of Physiology*. 51:401-408.

- Vassilev, P. M., T. Scheuer y W. A. Catterall. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241:1658-1661.
- Waechter, C. J., J. W. Schmidt y W. A. Catterall. 1983. Glycosylation is required for maintenance of functional sodium channels in neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 258:5117-5123.
- Weiss, R. E. y R. Horn. 1986. Functional differences between two classes of sodium channels in developing rat skeletal muscle. *Science* 233:361-364.

### ACERCA DE LOS CANALES DE CALCIO

- Armstrong, C. M. y D. R. Matteson. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67.
- Bean, B. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annual Review of Physiology* 51:367-384.
- Carbone, E. y H. D. Lux 1984. A low-voltage activated calcium conductance in embryonic chick sensory neurons. *Biophysical Journal* 46:413-418.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox y R. W. Tsien. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Tsien, R. W. 1987. Calcium currents in heart cells and neurons. En: *Neuromodulation*, L. K. Kaczmarek e I. B. Levitan (Eds.). Oxford University Press. pp. 206-242.

### ACERCA DE LOS CANALES DE POTASIO

- Armstrong, C. M. y J. Lopez-Barneo. 1987. External calcium ions are required for potassium channel gating in squid neurons. *Science* 236:712-714.
- Armstrong, C. M. y D. R. Matteson. 1986. The role of calcium ions in the closing of K channels. *Journal of General Physiology* 87:817-832.
- Blatz, A. L. y K. L. Magleby. 1987. Calcium-activated potassium channels. *Trends in Neurosciences* 10:463-467.
- Codina, J., A. Yatani, D. Grenet, A. M. Brown y L. Birnbaumer. 1987. The alpha subunit of G<sub>K</sub> opens atrial potassium channels. *Science* 236:442-445.
- Jones, S. W. y P. R. Adams. 1987. The M-current and other potassium currents of vertebrate neurons. En: *Neuromodulation*, L. K. Kaczmarek e I. B. Levitan (Eds.). Oxford University Press. pp. 159-186.
- Pfaffinger, P. J., J. M. Martin, D. D. Hunter, N. M. Nathanson y B. Hille. 1985. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature*: 536-538.
- Rogawski, M. A. 1985. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? *Trends in Neurosciences* 8:214-218.
- Siegelbaum, S. A. 1987. The S-current: a background potassium current. En: *Neuromodulation*, editado por L. K. Kaczmarek e I. B. Levitan (Eds.). Oxford University Press. pp. 187-205.
- Strong, J. A. y Kaczmarek. 1987. Potassium currents that regulate action potentials and repetitive firing. En: *Neuromodulation*, L. K. Kaczmarek e I. B. Levitan. (Eds.) Oxford University Press. pp. 119-137.
- Tempel, B. L., D. M. Papazian, T. L. Schwarz, Y. N. Jan y L. Y. Jan. 1987. Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of drosophila. *Science* 237:770-775.
- Vandenberg, C. A. 1987. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 84:2560-2564.

