

# El calcio en la transmisión nerviosa

LOURDES MASSIEU TRIGO\*

## ACERCA DE LOS CANALES DE CALCIO EN LA TRANSMISIÓN NERVIOSA

El movimiento de nuestro cuerpo, el control de nuestras emociones y sentimientos, así como nuestra capacidad de pensamiento, la debemos al correcto funcionamiento del sistema nervioso. Gran parte de lo que somos y hacemos depende de la actividad de nuestro cerebro.

El sistema nervioso está compuesto por unidades llamadas neuronas. Las neuronas son células que pueden comunicarse entre sí mediante mensajes, que al transmitirse de una a otra forman redes de comunicación que nos permiten hablar, caminar, sentir dolor o placer y ejercer funciones más complejas.

La mayor parte de la información que reciben las neuronas llega a las llamadas dendritas, que funcionan como antenas y de la misma manera que nuestros oídos, escuchan lo que la célula vecina quiere decir. El axón es la región encargada de conducir la información al igual que un cable telefónico lo hace cuando sostenemos una conversación, y la terminal o botón sináptico es la zona que, como nuestra boca, emite los mensajes que va a comunicar a las otras células. Además existe un cuerpo celular o soma encargado de mantener viva a la célula ya que es el sitio donde se fabrican todos los compuestos necesarios para su subsistencia (figura 1).

La unidad básica de la comunicación en el sistema nervioso se llama sinapsis y está formada por la terminal nerviosa de una neurona (presináptica) y la zona receptora de la neurona vecina o (postsináptica), es decir, entre "la boca y los oídos" de dos células contiguas (figura 2).

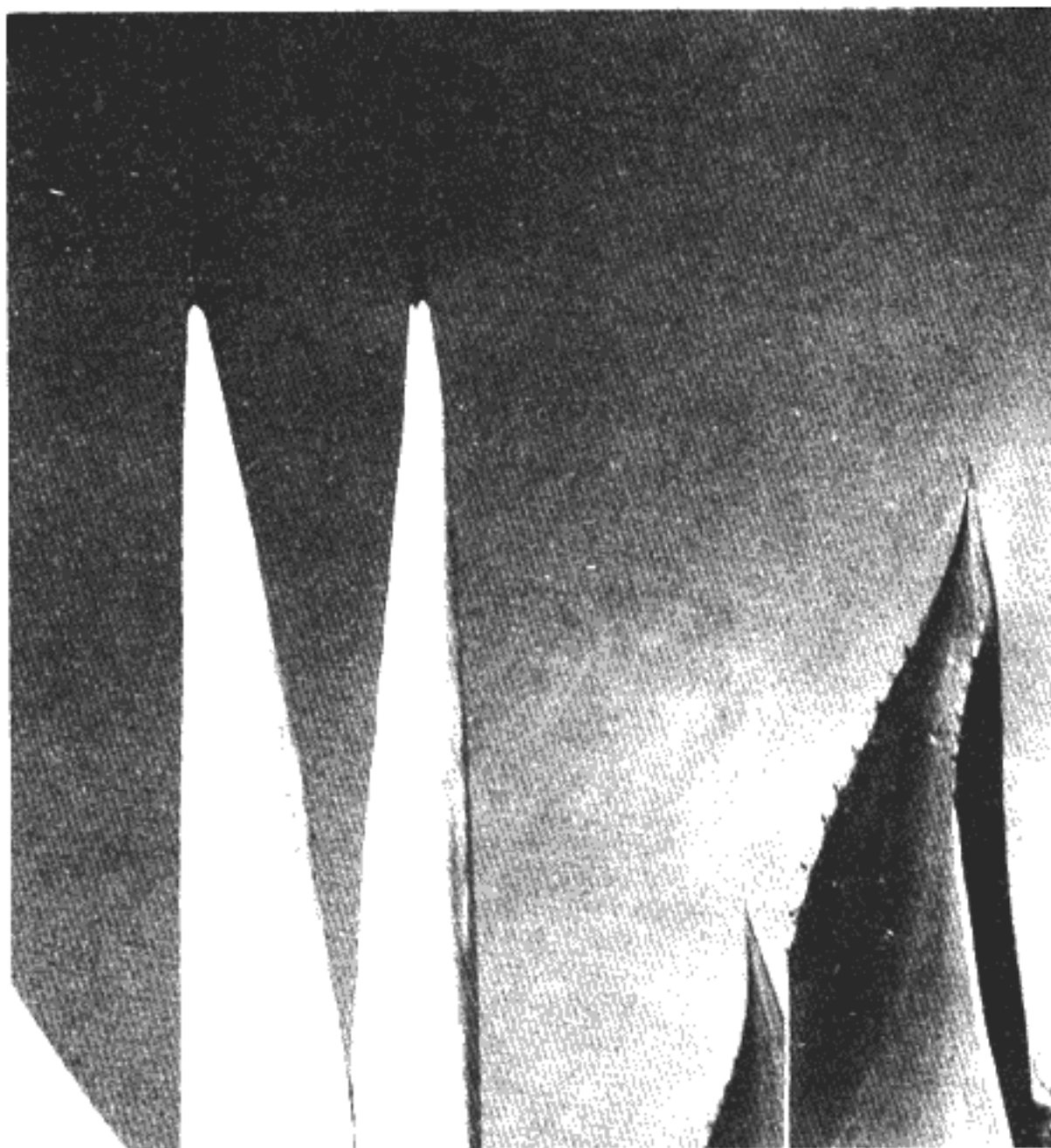


Foto: Mariana Yampolsky.

El tipo de sinapsis más común es entre una terminal axónica y una dendrita postsináptica y se denomina axo-dendrítica, pero también existen sinapsis axo-axónicas y axo-somáticas, lo que significa que el soma y el axón también pueden recibir la información. El elemento presináptico es generalmente una terminal nerviosa, sin embargo puede darse el caso de que este sitio está ocupado por una dendrita o por el soma.

Los mensajes emitidos por las células nerviosas pueden ser eléctricos o químicos, sin embargo las señales químicas han acaparado la atención debido a su enorme abundancia en el

\* Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

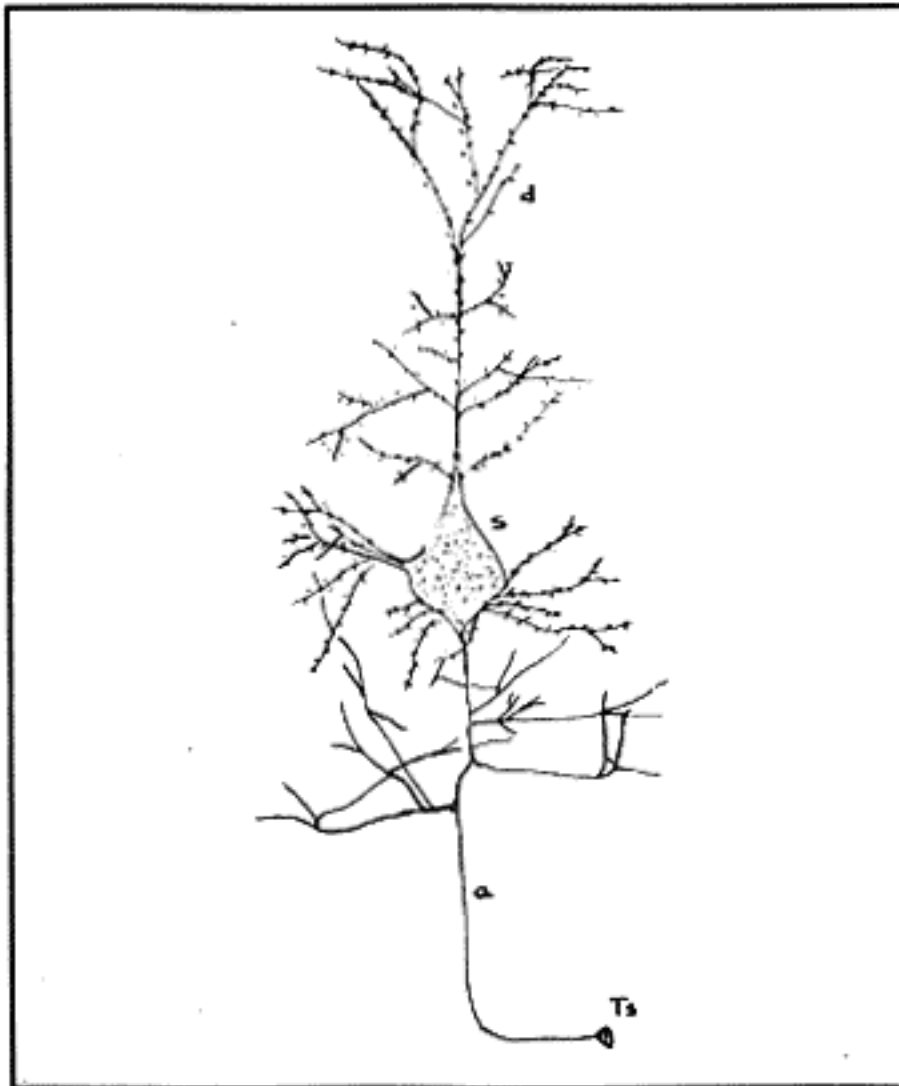


Figura 1. Esquema de una neurona piramidal de la corteza cerebral. s, soma; d, dendritas; a, axón; ts, terminal sináptica. Redibujado de Kuffler, S.W. y J.G. Nicholls. 1976. *From Neuron to Brain*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass. p.9.

sistema nervioso de los vertebrados. Este tipo de señales están mediadas por mensajeros químicos que son moléculas de diversa naturaleza. Entre éstos encontramos a el ácido gamma-amino-butírico (GABA) y a la acetilcolina que son las moléculas que se definieron por primera vez como neurotransmisores, y a los que se les considera como "neurotransmisores clásicos".

En la actualidad se han descubierto un gran número de moléculas neuroactivas entre las que se encuentran, las catecolaminas, la serotonina, y un gran número de péptidos, sin embargo, su definición como neurotransmisores no ha sido fácil. A mediados de este siglo se consideraba a un neurotransmisor como aquella molécula que se liberaba de la presinapsis a la llegada de un impulso nervioso y que era capaz de modificar la excitabilidad de la célula postsináptica. Sin embargo, Werman en 1966<sup>1</sup> intentó formalizar el concepto de neurotransmisor, describiendo una serie de criterios básicos que debía cumplir una sustancia para considerarse como neurotransmisor. Estos eran:

1. La sustancia propuesta como neurotransmisor debe ejercer la misma acción y a través de los mismos mecanismos que el transmisor natural.
2. Deben existir las enzimas responsables de la síntesis del transmisor putativo en la célula que lo contiene.
3. Debe existir un mecanismo de inactivación del transmisor, es decir, un sistema que lo elimine una vez terminada su acción.
4. El transmisor debe ser liberado de la terminal presináptica durante la estimulación.

5. El transmisor propuesto debe estar presente en la célula que lo produce.

6. Aquellos agentes farmacológicos que interactúan con el neurotransmisor deben interactuar de la misma forma con el transmisor propuesto.

En la actualidad los criterios descritos por Werman siguen siendo válidos aunque su aplicación es más rigurosa, por ejemplo, el criterio de liberación del transmisor establece que éste debe ser liberado de una manera dependiente de la entrada de iones calcio a la terminal nerviosa. Además de los criterios descritos anteriormente, en general se acepta que los neurotransmisores ejercen efectos de corta duración e interactúan con canales iónicos presentes en la membrana postsináptica, modificando su permeabilidad. Algunas de las moléculas que se han propuesto como neurotransmisores se muestran en la figura 3. Las células nerviosas como todas las células excitables, son capaces de conducir corrientes eléctricas generadas a través de su membrana plasmática. Gracias a la presencia de una membrana selectivamente permeable, la neurona puede mantener en su interior una condición diferente a la de su medio exterior, por ejemplo, la concentración de sodio ( $\text{Na}^+$ ) y calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) es mucho mayor en el exterior, y la de iones potasio ( $\text{K}^+$ ) y proteínas en el interior. El exceso de sodio en el exterior se traduce en una acumulación de cargas positivas, mientras que la presencia de las proteínas cargadas negativamente que retienen al potasio en el interior de la célula, le confieren al lado citoplásmico de la membrana una carga ne-

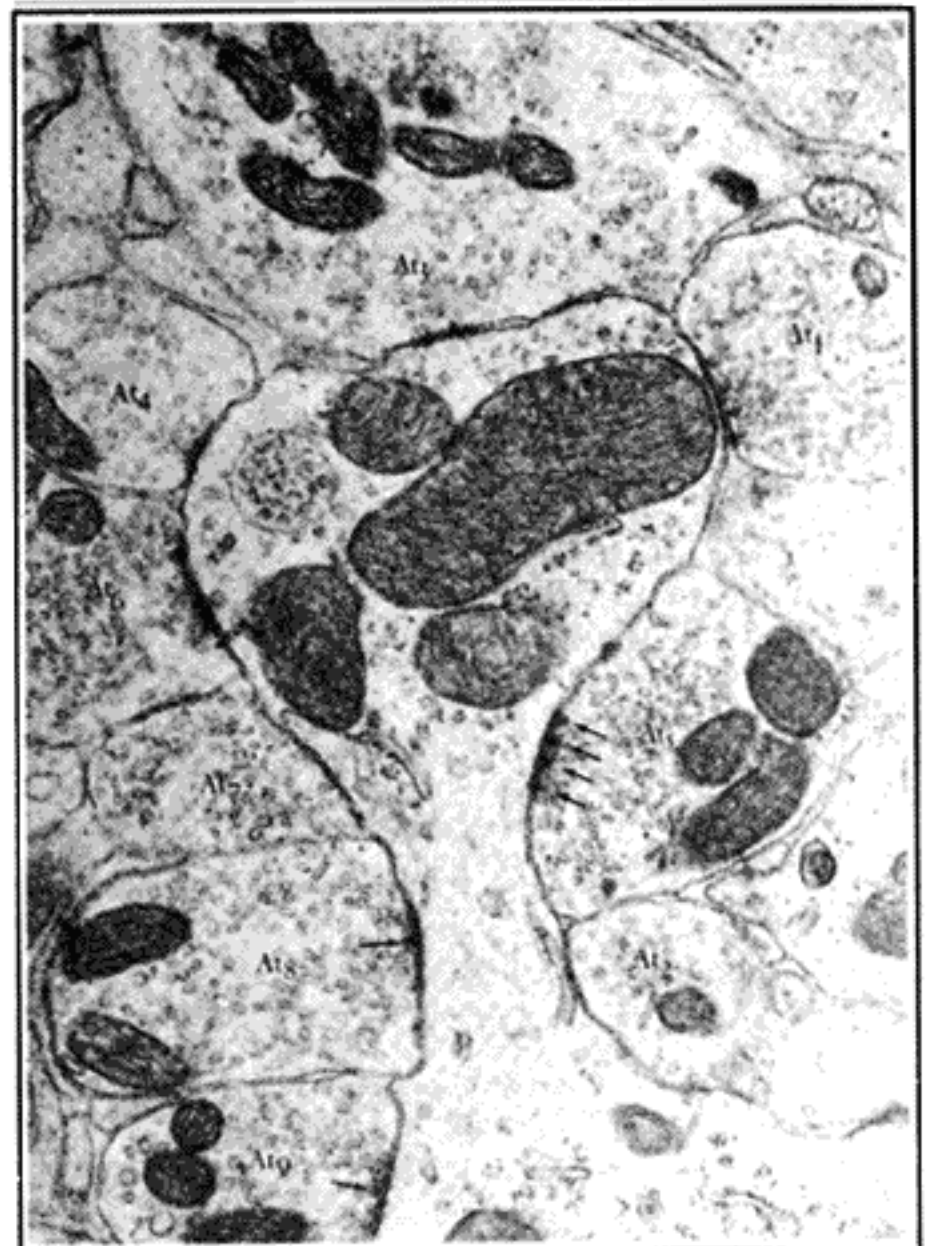


Figura 2. Micrografía electrónica de una variedad de sinapsis. En el centro hay una dendrita rodeada de una variedad de terminales axónicas (At1 a At9). Núcleo ventral coclear de rata adulta x 44 000. Tomado de Peters, A., S.L. Palay, y H. de F. Webster, 1976.

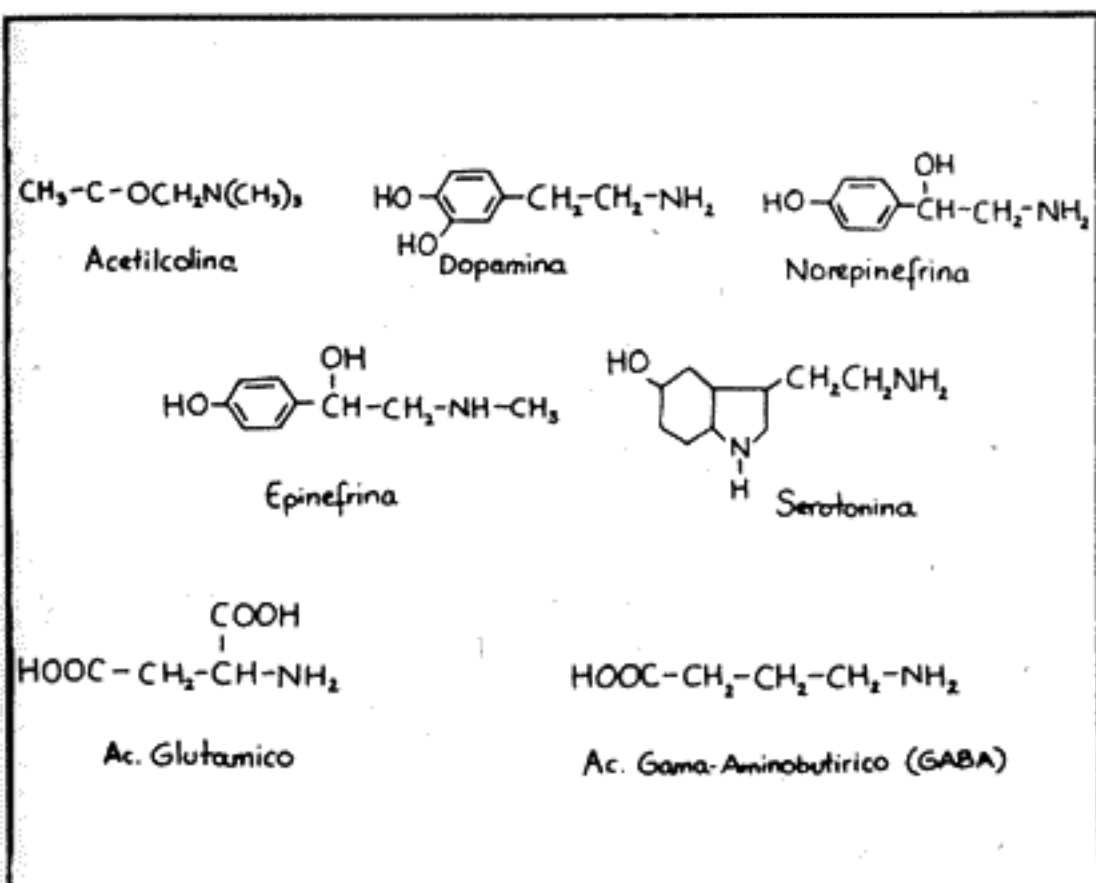


Figura 3. Estructura química de algunos neurotransmisores.

gativa. Se dice entonces que la neurona mantiene una diferencia de potencial a los lados de la membrana que es negativa en el interior con respecto al exterior y que es de aproximadamente -70 mv. Este potencial es el que mantienen las células en el reposo y por lo tanto recibe el nombre de potencial de reposo.

La diferencia de potencial de la membrana se modifica cuando se altera su permeabilidad a iones específicos, por ejemplo, si la membrana se hace más permeable a los iones ( $\text{Na}^+$ ), la corriente positiva entrante acarreada por estos cationes, trae como consecuencia que el potencial de membrana se haga más positivo de -70 mv, o incluso que el potencial se invierta, es decir, que ahora el lado interno sea positivo con respecto al externo. Así, cuando el potencial se hace más positivo que el potencial de reposo se dice que la célula se despolariza y se excita. Por el contrario, cuando la membrana se hace más permeable al cloro y éste difunde al interior, o al potasio y éste sale, el potencial de membrana se hace más negativo y por lo tanto la célula se hiperpolariza y se inhibe.

Estos cambios de permeabilidad a iones específicos ocurren en la membrana cuando se abren canales iónicos (dependientes de voltaje), o bien, son provocados por la interacción de un neurotransmisor con su receptor, que también puede estar acoplado a un canal iónico. Así, los neurotransmisores son excitadores o inhibidores dependiendo del efecto que ejerzan sobre la membrana postsináptica. La acción de un transmisor depende entonces del ión cuya permeabilidad sea alterada en la membrana postsináptica. ¿Cómo puede una molécula neuroactiva excitar o inhibir a la neurona con la cual interactúa?

Como dijimos, el efecto se traduce en un cambio en la permeabilidad a iones específicos, pero ¿cómo ocurre este proceso?

En la superficie de la membrana postsináptica hay receptores que no son más que proteínas capaces de reconocer moléculas específicas como dos piezas de rompecabezas se reconocen entre sí. Estas proteínas receptoras pueden estar acopladas a un canal iónico o a la cadena de síntesis de un

segundo mensajero como el cAMP, el cGMP o el inositol trifosfato.

Un receptor se caracteriza por tener un sitio de unión extramembranal para el ligando, en este caso, un sitio que sea reconocido por el neurotransmisor, y una porción transmembranal que conforme el canal iónico. En el caso de que el receptor esté acoplado a una cadena de síntesis de un segundo mensajero, el receptor también contiene el sitio de unión al ligando, pero en este caso la proteína transductora de la señal (por ejemplo la adenilato ciclasa o la proteína G), no forma parte integral del receptor, sino que está asociada al lado citoplásmico de la membrana celular. En este caso, el receptor presenta una región del lado citoplásmico que interactúa con la proteína transductora. De esta manera, la unión del transmisor con su receptor produce un cambio conformacional en éste que se traduce en la apertura o cierre del poro o en la activación de una proteína transductora, que desencadena la síntesis de un segundo mensajero. Así por ejemplo la unión del GABA —que es un neurotransmisor inhibitorio— a su receptor, produce un incremento en la permeabilidad al cloro que se traduce en una hiperpolarización debido a la

entrada del ión cloruro que está cargado negativamente. En cambio, la unión de la acetilcolina al receptor nicotínico origina la entrada de iones sodio a través del poro formado por las subunidades de la proteína, y la célula se despolariza (figuras 4 y 5).

Un receptor puede definirse en términos farmacológicos ya que no sólo reconoce al neurotransmisor endógeno, sino que también puede interactuar con diversos fármacos o toxinas. Por ejemplo el receptor nicotínico de la acetilcolina, además de reconocer a la acetilcolina, puede ser bloqueado por el curare y la alfa bungarotoxina. El conocimiento de la farmacología de un receptor es de gran utilidad, ya que en general los fármacos sintéticos tienen mayor afinidad por el receptor que el propio neurotransmisor, y por lo tanto, el estudio de la interacción y de las características de la unión de un fármaco con su receptor, ha determinado en gran medida el conocimiento actual de muchos receptores.

Habiendo comprendido los conceptos de neurotransmisor y receptor, podemos decir que la comunicación entre las células nerviosas depende tanto de la naturaleza del neurotransmisor como del receptor. Así tenemos que un mismo neurotransmisor puede tener efectos opuestos dependiendo del receptor con el cual interactúe. El receptor colinérgico nicotínico característico del sistema nervioso periférico, está acoplado a un canal de sodio y por tanto, el efecto de la acetilcolina sobre este receptor es excitador. Por el contrario, el receptor muscarínico colinérgico del sistema nervioso central, puede estar acoplado a la adenilato ciclasa, a través de la cual modula el canal de potasio y por lo tanto, la interacción de la acetilcolina con este receptor puede tener un efecto inhibitorio.

En los últimos párrafos nos hemos ocupado de los efectos postsinápticos de una molécula neuroactiva, es decir de cómo escuchan y de lo que escuchan las células. Pero ¿cómo es que un neurotransmisor es liberado?

Los neurotransmisores no son liberados desordenadamente sino que su secreción obedece a las señales que recibe la célula. Cuando una célula se excita y transmite la señal excitadora



desde sus receptores hasta la terminal sináptica, como una onda que se propaga, se libera el neurotransmisor. Sin embargo, no es suficiente con que una célula se despolarice sino que es necesaria la entrada de iones calcio a la terminal nerviosa a través de canales específicos. Estos canales son proteínas de membrana y su apertura o cierre depende del voltaje, de modo que cuando la célula se despolariza y alcanza cierto potencial los canales se abren, mientras que durante el reposo permanecen cerrados.

Aunque el mecanismo de liberación de transmisores no se conoce la hipótesis del calcio propone que la entrada de este catión facilita la fusión de las vesículas que contienen al transmisor con la membrana plasmática liberándose las moléculas por exocitosis (figura 6). Este proceso contribuye al llamado "retardo sináptico" que es el período de tiempo que transcurre entre la estimulación de la terminal presináptica y la generación de la respuesta postsináptica. Este retardo puede ser desde 0.3 hasta de 1 a 5 mseg, y está dado por el tiempo que requiere la apertura de los canales de calcio, y la secreción del transmisor. Otro componente de este retardo está dado por el tiempo que tarda el transmisor en difundir a la terminal postsináptica, interactuar con su receptor y desencadenar la respuesta postsináptica.

El mecanismo de exocitosis se demostró por primera vez en la placa neuromuscular de la rana,<sup>3</sup> en donde se conoce que la acetilcolina se libera en paquetes llamados quanta. Los quanta corresponden a la cantidad de neurotransmisor contenido en

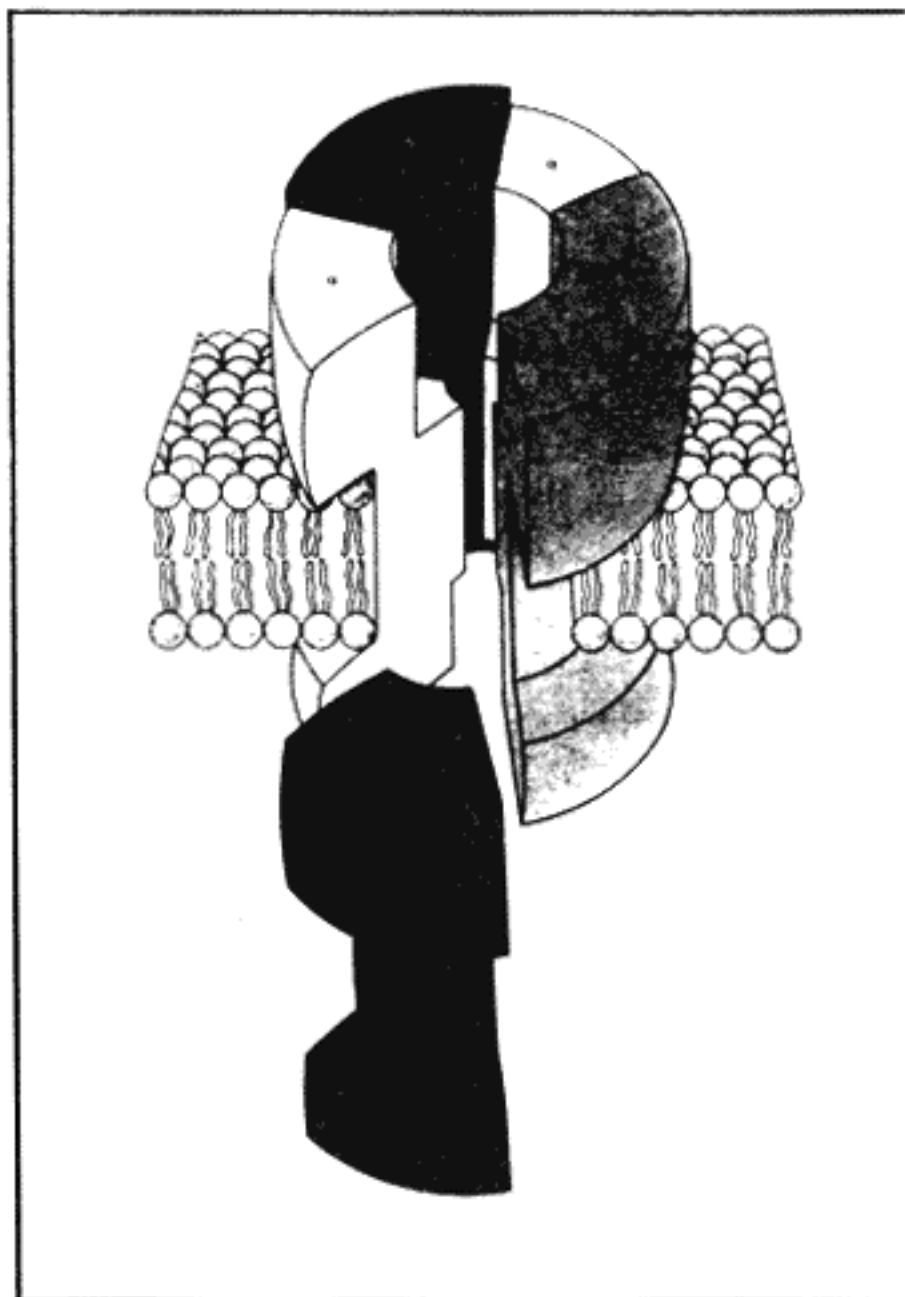


Figura 4. Modelo tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina. Tomado de Kandel, E. y J.H. Schwartz, 1985. *Principles in Neural Science* 2da Ed. Elsevier. New York. p. 161.

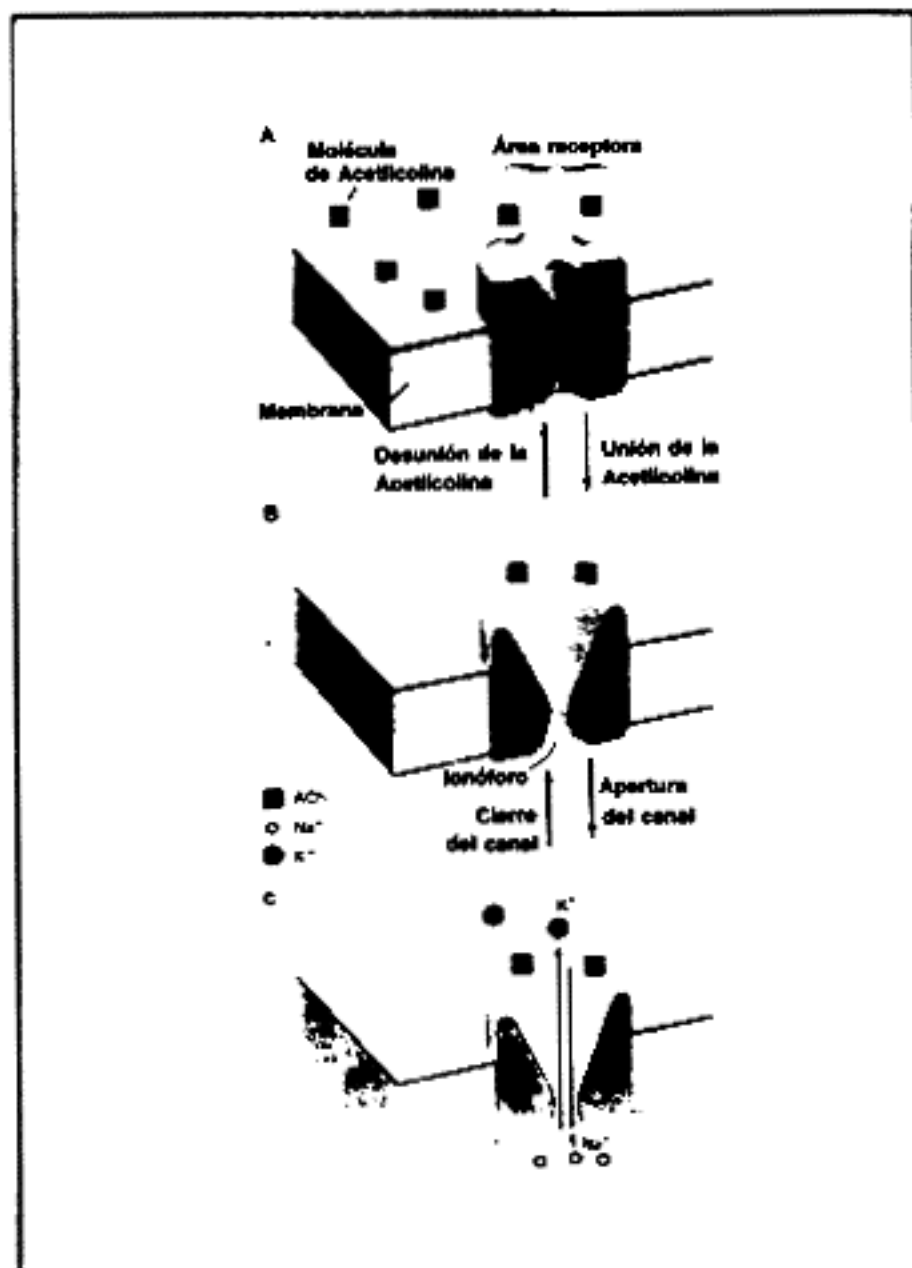


Figura 5. El receptor nicotínico de acetilcolina cambia de conformación cuando la acetilcolina se une a él, para permitir el paso de iones a través de la membrana. A. Durante el reposo, el receptor no permite el paso de iones. B. Dos moléculas de acetilcolina se unen a las subunidades  $\alpha$  expuestas en la superficie externa de la membrana, y forman el complejo receptor-acetilcolina. Este complejo cambia su conformación y esto resulta en la apertura del canal formado por la porción de las 5 subunidades embebidas en la bicapa lipídica de la membrana. C. El canal deja pasar a los iones  $\text{Na}^+$  y otros iones al interior celular provocando cambios postsinápticos en el potencial de membrana. Como la concentración de  $\text{K}^+$  es mayor en el interior celular, este catión sale de la célula. Tomado de Kandel, E. y J.H. Schwartz 1985. *Principles in Neural Science*. 2da Ed. Isevier. New York. p. 163.

las vesículas. Aunque la vesiculación de los neurotransmisores no se ha demostrado en todos los casos, por lo menos no para los aminoácidos, la importancia del calcio en la neurosecreción es un hecho bien establecido que se ha demostrado en la mayoría de las sinapsis estudiadas.

Los mecanismos moleculares responsables de la liberación de transmisores no se conocen. Sin embargo, recientemente se han estudiado algunas de las proteínas asociadas a las vesículas sinápticas, posiblemente involucradas en el proceso de la neurosecreción (para revisión ver Trimble y Scheller, 1988)<sup>4</sup>. Dentro de estas proteínas se encuentra la sinaptofisina, que es una proteína membranal que copurifica con las vesículas sinápticas de las células nerviosas y neuroendócrinas. Esta proteína se encuentra asociada a vesículas sinápticas pequeñas (que contienen neurotransmisores clásicos) y no a las vesículas grandes peptidárgicas. Además es capaz de unir iones calcio aparentemente a través de una región situada del lado citoplásmico de la vesícula, y es susceptible de fosforilarse. Probablemente está involucrada en la exocitosis de vesículas pequeñas en las células nerviosas. Otra de las proteínas asociadas a

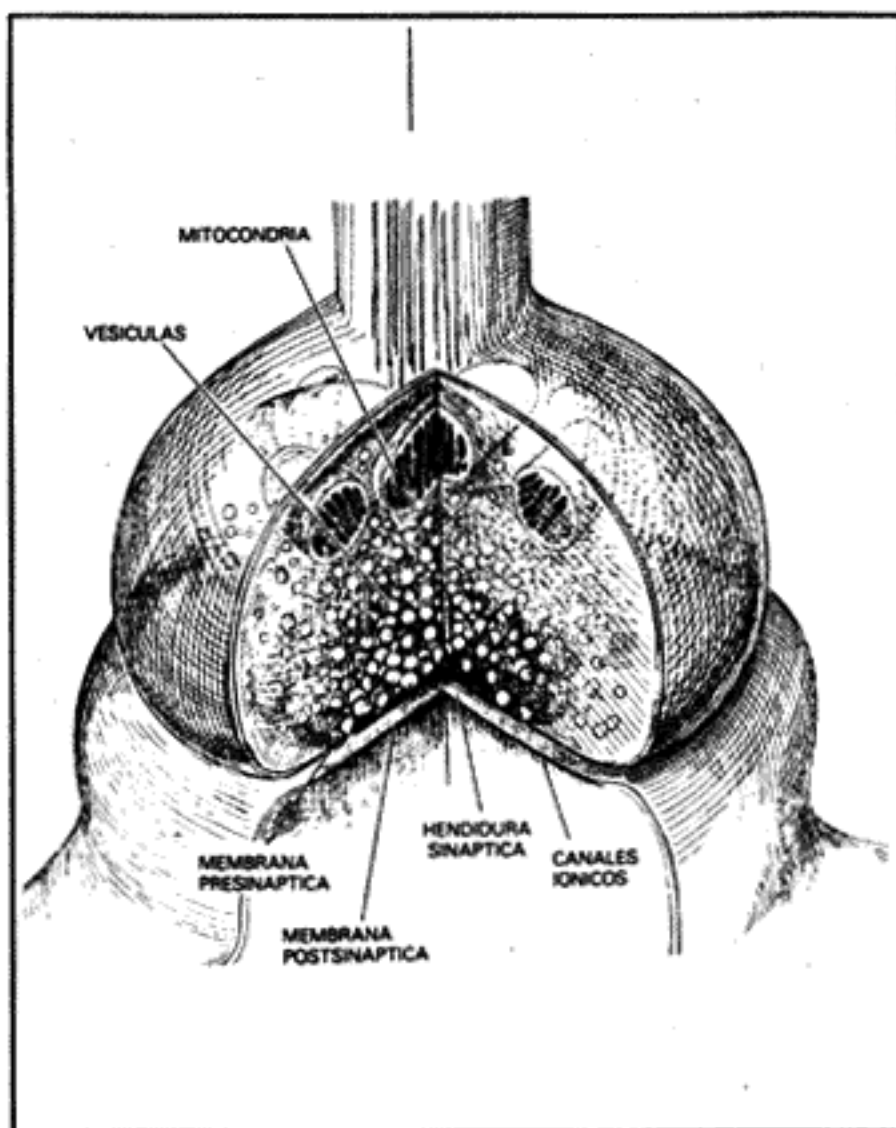


Figura 6. Esquema de una sinapsis donde se muestra la liberación por exocitosis. Tomado de Stevens, Ch. F. 1979. *El Cerebro. Investigación y Ciencia*. Edición en español de *Scientific American*, p. 25.

las vesículas, es la sinapsina I, que es una fosfoproteína. Esta proteína es capaz de unirse a elementos del citoesqueleto celular, y por esta razón se sugiere que interviene en el control del número de vesículas disponibles para liberarse, anclándolas al citoesqueleto. Es interesante hacer notar, que ambas proteínas son ricas en residuos de prolina en el lado citoplásmico, característica que también comparten con otra proteína asociada a vesículas, recientemente descrita, la VAMP-1. Esta característica común posiblemente implica que las tres proteínas comparten ciertas características funcionales.

Dada la importancia de la entrada de calcio por canales dependientes de voltaje para la liberación de neurotransmisores, el estudio de estos canales es entonces fundamental en el entendimiento de los mecanismos que hacen posible la neurosecreción, y es esto lo que nos ocupará a lo largo de las siguientes líneas.

Una de las aproximaciones experimentales más comunes para el estudio de un canal, es la utilización de drogas capaces de unirse específicamente a él y modificar su actividad. Este enfoque ha sido de gran utilidad en el caso del canal de  $\text{Na}^+$  dependiente de voltaje, ya que gracias a la existencia de una droga denominada tetrodotoxina (TTX) que bloquea específicamente este canal, es que se ha podido purificar y conocer tanto sus propiedades estructurales como funcionales. Lo mismo ha ocurrido para algunos receptores, por ejemplo el de la acetilcolina, que es bloqueado específicamente por la alfabun-garotoxina derivada del veneno de la cobra.

Sin embargo, desgraciadamente no se conocía hasta hace algunos años una droga que se uniera en forma específica a los canales de calcio dependientes de voltaje en las neuronas, es decir, los canales involucrados en la neurosecreción. A pesar

de esto se hicieron muchos intentos por identificar estos canales y se conoce que son bloqueados por cationes inorgánicos como el magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), el manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ) y el lantano ( $\text{La}^{3+}$ ). Como consecuencia del bloqueo de los canales de calcio, estos cationes inhiben la liberación de transmisores.

El rojo de rutenio (RRu) es otro compuesto que bloquea la entrada de calcio a la terminal sináptica y como consecuencia inhibe la liberación de transmisores como el GABA y la acetilcolina. Además en el ratón, esta droga puede tener consecuencias tan impresionantes como la inducción de convulsiones cuando se inyecta intracranealmente, o de una parálisis flácida en el caso de la inyección intraperitoneal.<sup>6</sup> Estos resultados pueden explicarse como una inhibición de la transmisión GABAérgica en el sistema nervioso central en el primer caso, o como la interrupción de la transmisión colinérgica neuromuscular del sistema nervioso periférico, en el segundo. Es este entonces un claro ejemplo de la importancia del calcio en la neurotransmisión y por tanto, en el correcto funcionamiento de nuestro sistema nervioso.

Por otra parte, existen moléculas como las aminopiridinas que tienen el efecto opuesto, es decir, facilitan la neurotransmisión. Dentro de estas se encuentra la 4-aminopiridina (4-AP) que es capaz de incrementar la cantidad de quanta de acetilcolina liberados de la placa neuromuscular<sup>8</sup> y estimular la liberación espontánea de GABA y acetilcolina de terminales nerviosas aisladas.<sup>9</sup> Más aún, la 4-AP puede contrarrestar el efecto paralizante del rojo de rutenio *in vivo*.<sup>7</sup> Aunque el mecanismo de acción de la 4-AP no se conoce, se ha propuesto que facilite la transmisión nerviosa a través del bloqueo de la corriente saliente de potasio,<sup>10</sup> o bien ejerciendo un efecto directo sobre los canales de calcio dependientes de voltaje.<sup>11</sup>

Aunque el sitio en la membrana en donde interactúan el RRu y la 4-AP no se conoce, puede sugerirse que sea el canal de calcio dependiente de voltaje ya que ambos compuestos alteran la liberación de transmisores interviniendo con la entrada de calcio a la terminal. ¿Cómo es entonces el canal de calcio? ¿Qué sabemos acerca de él?

Durante la última década gracias a la aparición de una familia de moléculas, las dihidropiridinas (DHP), han podido resolverse por lo menos en parte estas preguntas. Las DHP se unen selectivamente a canales de calcio dependientes de voltaje en el músculo cardíaco, liso y esquelético. Hay que recordar que las células musculares son también excitables y que el calcio es determinante en el acoplamiento entre la excitación y la contracción. Hay algunas DHP como la nitrendipina y la nifedipina que bloquean la entrada de calcio a la célula y por consiguiente interrumpen la contracción relajando al músculo. En este caso se han denominado como antagonistas de los canales de calcio. Mientras que otras, a pesar de tener una estructura molecular muy similar, ejercen el efecto contrario, es decir, funcionan como facilitadoras de la entrada de calcio contrayendo al músculo<sup>12,13</sup> y se denominan como agonistas de los canales de calcio sensibles a voltaje. Un ejemplo de éstas moléculas es el BAY K 8644 (figura 7).

El canal de calcio sensible a las dihidropiridinas sólo se ha purificado a partir de los túbulos transversos del músculo esquelético y se sabe que está formado por 5 subunidades:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$

\* Las terminales nerviosas aisladas también reciben el nombre de sinaptosomas y se obtienen al separar las terminales sinápticas del resto de la célula por centrifugación. Estas terminales llevan a cabo sus funciones metabólicas incluyendo la neurosecreción.



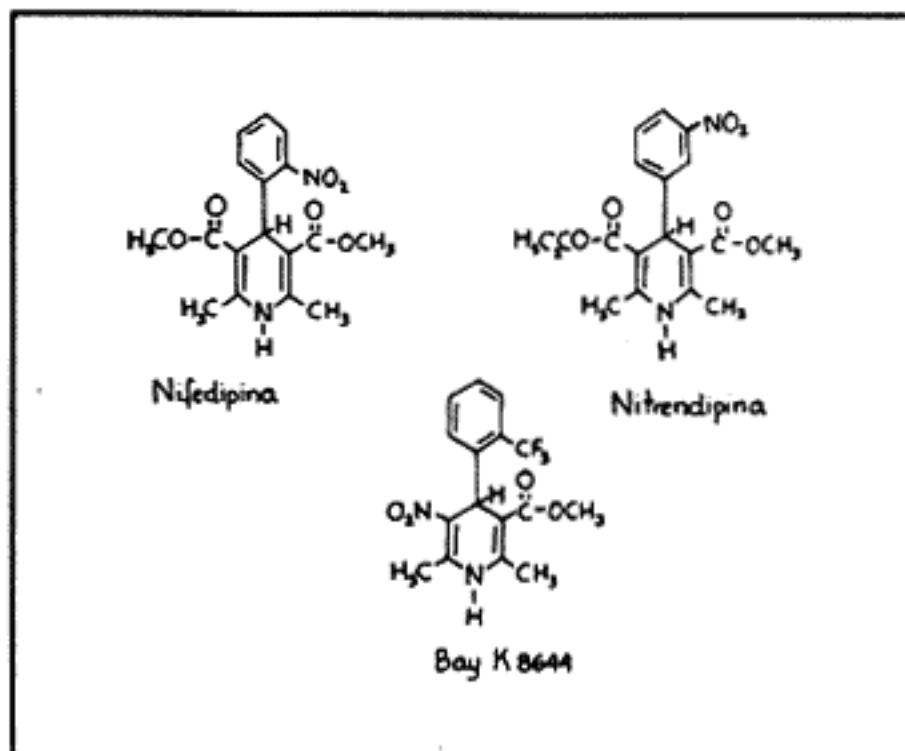


Figura 7. Estructura molecular de algunas dihidropiridinas, dos antagonistas de calcio, la nitrendipina y la nifedipina, y un agonista de calcio, el BAY K 8644.

y  $\delta$  no unidas covalentemente y con pesos moleculares de 175, 143, 53, 33 y 27 kDa respectivamente.<sup>14</sup> De acuerdo a esto se ha propuesto un modelo estructural del canal en donde la subunidad  $\alpha_1$  es el polipéptido transmembranal que conforma el poro o canal permeable al calcio, y que además contiene el sitio de unión a las DHP y un sitio de fosforilación<sup>14</sup> (ver figura 8). Además, esta subunidad parece contener también el sensor de voltaje para el acople excitación-contracción, ya que la inyección del ADN complementario que codifica para esta subunidad, es capaz de restaurar el acople excitación-contracción en células musculares cultivadas de una cepa mutante de ratón que no contiene esta proteína.<sup>15</sup>

Aunque el canal de calcio de los músculos liso y cardíaco no se ha purificado, sí se ha identificado inmunológicamente una subunidad común en los tres tipos de músculo, que corresponde a una de las subunidades  $\alpha$  del músculo esquelético.<sup>16</sup>

Hasta el momento hemos hablado del canal de calcio muscular pero ¿qué hay del canal de calcio neuronal?

En el sistema nervioso se ha identificado un canal de calcio sensible a las DHP, esto es, las DHP reconocen y se unen a sitios específicos en la membrana neuronal.<sup>17</sup> Estos sitios se encuentran tanto en la membrana del soma como en la de la terminal sináptica.

Este canal de calcio o receptor a las DHP\* no se ha purificado en el sistema nervioso pero al parecer es similar al del músculo esquelético ya que se ha identificado inmunológicamente una glicoproteína de 169 000 daltones que corresponde a una de las subunidades  $\alpha$  del músculo esquelético. Sin embargo, esta subunidad no es idéntica a la del receptor muscular lo que sugiere que sólo una parte de la estructura del canal muscular es igual a la del cerebro. Además, la existencia del resto de las subunidades no se ha corroborado en el sistema nervioso.<sup>16</sup>

La ventaja que ofrecen las DHP es obvia, pues ahora contamos con una herramienta para marcar y estudiar un sitio específico en la membrana neuronal, el canal de calcio. Pero ¿có-

\* Desde este momento me referiré al canal de calcio y al receptor a las DHP para designar a una misma entidad molecular en la membrana, ya que en el músculo, se conoce que el sitio de unión a las DHP y el canal de calcio forman parte de la misma proteína.

mo es este canal en las células nerviosas?, ya dijimos que se parece al muscular, pero ¿podría ser el acoplado a la liberación de neurotransmisores?

Bajo la premisa de que toda aquella molécula que bloquee o interfiera con los canales de calcio dependientes de voltaje en la terminal nerviosa, altera la liberación de moléculas neuroactivas, la pregunta inmediata a contestar es si las DHP pueden alterar la liberación de transmisores. Vale la pena aclarar en este momento que el hecho de que una molécula se una a su receptor no significa necesariamente que esta unión tenga una consecuencia fisiológica, en este caso, una modificación en el flujo de calcio y por ende de la salida del transmisor.

Varios estudios han intentado responder a esta pregunta pero desafortunadamente existe un gran desacuerdo en la literatura y no se ha podido demostrar con claridad que las DHP están involucradas en el proceso de la liberación de neurotransmisores.

Estos resultados nos plantean la siguiente disyuntiva: mientras que las dihidropiridinas se unen a canales de calcio funcionales en la membrana muscular, es decir, a canales sensibles a voltaje ligados al acople excitación-contracción, en el sistema nervioso las DHP se unen a un sitio en la membrana cuya funcionalidad no es clara.

¿Entonces cómo podemos explicar que una misma molécula se una a receptores parecidos en diferentes tejidos pero con implicaciones funcionales distintas? Esta pregunta la retomaremos más adelante.

Hasta el momento contamos con dos conocimientos importantes:

1. Hay un sitio en la membrana neuronal al cual se unen las DHP, con una composición similar al del músculo esquelético que corresponde a un canal de calcio sensible a voltaje.
2. Sabemos que hay tres compuestos, el  $RR_u$ , el lantano y la 4-AP que modifican la liberación de transmisores probablemente interactuando con los canales de calcio sensibles a voltaje.

Si ligamos estas dos afirmaciones podemos imaginar que

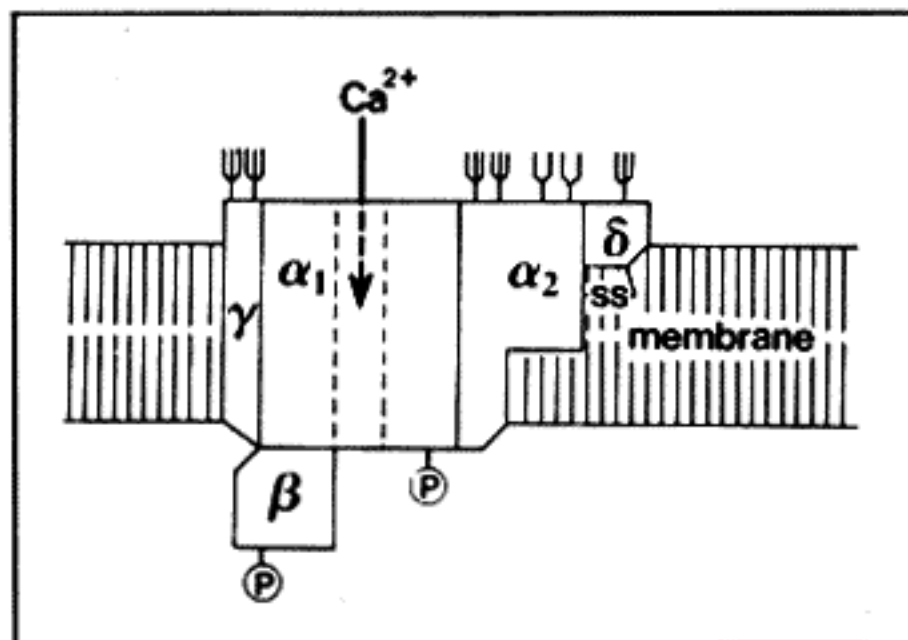


Figura 8. Modelo propuesto para la estructura del canal de calcio. Los sitios de fosforilación dependiente de  $AMP_c$  (P), de glicosilación (Y) y de interacción con la membrana están indicados. Tomado de Takahashi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 pp. 5478-5482.

las DHP y los otros tres compuestos pudieran compartir un mismo sitio de unión en la membrana. Esto es, si el sitio identificado por las DHP es un canal de calcio sensible a voltaje, y suponemos que el  $RR_u$ , el lantano y la S4-AP actúan a través de canales dependientes de voltaje podemos preguntarnos si todas estas moléculas comparten el mismo sitio de unión en la membrana sináptica.

Experimentos orientados a resolver este cuestionamiento indican que ni el  $RR_u$  ni la 4-AP se unen al receptor de las DHP en la membrana sinaptosomal. Además se demostró que las DHP tanto agonistas como antagonistas de calcio no tienen ningún efecto sobre la liberación de GABA y acetilcolina en sinaptosomas.<sup>18</sup>

De acuerdo a esto se sugiere que si bien el canal identificado por las DHP es un canal de calcio dependiente de voltaje, no es el mismo con el que interactúan la 4-AP ni el  $RR_u$ , ni tampoco es el canal acoplado a la liberación de transmisores. ¿Significa esto que puede existir más de un canal de calcio dependiente de voltaje en la membrana neuronal?

Hasta el momento se han identificado electrofisiológicamente en el músculo cardíaco y liso dos canales, uno lento o L, y uno rápido o T. En las neuronas del sistema nervioso periférico además de estos dos canales existe un tercero llamado N. Estos tres canales tienen diferentes propiedades que permiten distinguirlos<sup>19</sup>. El canal T se caracteriza por llevar una corriente muy pequeña, por ser activado con despolarizaciones pequeñas e inactivado muy rápidamente. El canal L transporta una corriente muy grande, requiere de despolarizaciones fuertes para despolarizarse y se inactiva muy despacio, y el canal N lleva una corriente intermedia entre la de los canales T y L, es también activado por fuertes despolarizaciones, pero su inactivación es más rápida (ver tabla I).

Farmacológicamente también podemos distinguir a los tres canales: mientras que el canal L es sensible a las DHP tanto en el músculo como en el sistema nervioso, los canales N y T no lo son. Además existe una toxina derivada del caracol marino *Conus geographus* denominada w-conotoxina, que bloquea irreversiblemente a los canales N y L pero no al T en el sistema nervioso, mientras que el canal L muscular no es afectado por la toxina.<sup>20</sup>

En las células del sistema nervioso central como las del hipocampo existen también dos tipos de canales que parecen corresponder al L y al N.<sup>21</sup>

Esto demuestra que no sólo podemos encontrar diferentes canales de calcio en distintos tejidos como el muscular y el nervioso, sino que dentro de un mismo tejido, el nervioso, existen varios tipos de canales. Surge entonces la pregunta inmediata del por qué de esta diversidad. Hasta el momento sólo podemos resolver parcialmente esta pregunta.

En los párrafos anteriores mencionamos que el papel de las DHP en la neurosecreción está en discusión. Sin embargo, es interesante mencionar que la mayoría de los trabajos que favorecen esta hipótesis se han realizado en preparaciones con células completas como rebanadas de cerebro o cultivos de células, mientras que los trabajos en sinaptosomas son contradictorios. Esto sugiere que los canales L sensibles a las DHP se distribuyen diferencialmente en la neurona.<sup>22</sup>

La existencia de una mayor población de canales L en el soma y/o en las dendritas en comparación con las terminales, pudiera explicar porque los efectos de las DHP son más claros cuando se utilizan células completas.

Ahora bien, si existen canales L en la terminal ¿porqué no se comportan igual que los del soma?

La respuesta puede estar en los canales N. Estos canales son exclusivos del sistema nervioso y no son sensibles a las DHP pero sí a la w-conotoxina. Se ha demostrado en varias preparaciones, incluyendo a los sinaptosomas, que estos canales se encuentran en la presinapsis y que al bloquearse se interrumpe la corriente de calcio y la salida del transmisor.<sup>20,21</sup> Estos canales entonces son probablemente los acoplados a la liberación de los neurotransmisores.

Al igual que el canal L, el canal N se encuentra tanto en el soma como en las terminales. Esto puede explicar la dificultad para correlacionar a las DHP con la neurosecreción, pues el exceso de canales N en la terminal puede enmascarar el pequeño efecto que tiene sobre la corriente total de calcio el bloqueo de los canales L. O bien, una explicación alternativa pudiera ser que los dos tipos de canales se encuentren coexistiendo en todas las regiones de la neurona pero que su microdistribución sea tal que sólo los canales N están acoplados a la neurosecreción, es decir, que se encuentren más cercanos a los sitios de liberación de transmisores.

De acuerdo a esto podemos sugerir que el  $RR_u$  y la 4-AP modifican la liberación de transmisores a través del canal N probablemente acoplado a la neurosecreción, y no del canal L.

Hasta el momento hemos asignado a los canales de calcio como única función la liberación de transmisores y por ende suponemos que están en la presinapsis. Pero ¿cómo podemos explicar su presencia en el soma o las dendritas?

El aumento en la concentración intracelular de calcio no sólo es importante en el proceso de la neurosecreción, sino también en el control de la excitabilidad neuronal. En este sentido, se ha propuesto que la entrada de calcio a las células nerviosas por sitios somáticos o dendríticos, puede ser determinante en la génesis de crisis epilépticas. Se ha observado con electrodos sensibles a calcio, que una considerable disminución en la concentración de calcio externo (como consecuencia de la entrada

Tabla I

Propiedad	Tipo de canal		
	T	N	L
Intervalo de Activación (10uM Ca)	Positivo a -70 mv	Positivo a -10 mv	Positivo a -10 mv
Intervalo de Inactivación	de -100 a -60 mv	> de -100 a -40 mv	de -60 a -10 mv
Conductancia aproximada	9 ps	13 ps	25 ps
Bloqueo por Cadmio	Débil IC <sub>50</sub> = 100uM	Fuerte IC <sub>50</sub> = 10uM	Fuerte IC <sub>50</sub> = 10uM
Bloqueo por w-Conotoxina	Débil	Fuerte	Fuerte
Modulación por DHP	No	No	Si



de este catión a la célula por sitios somáticos), precede a la generación de la actividad epiléptica en la corteza cerebral.<sup>23</sup>

De acuerdo a lo anterior cabe preguntarse si los canales de calcio sensibles a las DHP intervienen en este fenómeno. Efectivamente, se ha demostrado que algunas DHP antagonistas de los canales de calcio tienen propiedades antiepilépticas, mientras que, por el contrario, los agonistas generan crisis convulsivas.<sup>24,25</sup> Esto sugiere que probablemente el canal de calcio de tipo L tiene como función la regulación de la excitabilidad neuronal dependiente de la entrada de calcio.

En cuanto al canal T, hasta el momento no se conoce si tiene una localización especial ni se le ha asignado una función específica.

Finalmente concluimos que existe en el sistema nervioso una multiplicidad de canales de calcio probablemente con diferente localización y función. Este fenómeno no es privativo de los canales de calcio, pues se conocen también varios canales de potasio y es muy probable que esta diversidad exista para otros canales iónicos.

A lo largo de esta pequeña revisión mencionamos tres ejemplos en donde el transporte de calcio a través de canales sensibles a voltaje tiene consecuencias diversas dependiendo del canal por el cual sea transportado y el sitio donde se ubique el canal. El transporte a través del canal L origina la contracción muscular o la generación de descargas epileptogénicas, mientras que el transporte por el canal N tiene como consecuencia la liberación de moléculas neuroactivas.

Por el momento lo que conocemos de los canales de calcio lo debemos en gran parte a la electrofisiología y a la farmacología, el siguiente paso está en manos de la biología molecular. Una vez que se cuente con un conocimiento más profundo de la biología molecular de los canales, podremos entender mucho más acerca de su estructura, su función y la homología que pueda existir entre ellos.

Probablemente todos estos canales tienen una estructura molecular similar y sólo algunas pequeñas diferencias son suficientes para conferirles una función diferente, o tal vez, el simple hecho de localizarse preferencialmente en algún sitio de la membrana determine su funcionalidad. No podemos contestar esto aún, pero sí tenemos muy clara la importancia del estudio de los canales de calcio en el sistema nervioso, y no sólo de éstos, sino también de otros canales iónicos como los de sodio y potasio, ya que, la comunicación nerviosa depende en gran medida de su presencia y su correcto funcionamiento. □

## REFERENCIAS

1. Werman, R. 1966. Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 18 : 421-425.
2. Miledi, R. 1973. Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 183 : 421-425.
3. Katz, B. y R. Miledi. 1967. The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. *Proc. R. Soc. B* 167 : 23-38.
4. Trimble, W.S. y R.H. Scheller, 1988. Molecular biology of synaptic vesicle-associated proteins. *TINS* 11 : 241-242.
5. Blaustein, M.P. 1975. Effects of potassium, veratridine and scorpion venom on calcium accumulation and transmitter release by nerve terminals in vitro. *J. Physiol.* 247 : 617-655.
6. Tapia, R. 1985. Effects of drugs on neurotransmitter release: experiments in vivo and in vitro. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9:391-397.
7. Thesleff, S. 1980. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neuroscience* 5 :1413-1419.

8. Lundh, H. 1978. Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* 153 : 307-318.
9. Tapia, R. y M. Sitges 1982. Effect of 4-aminopyridine on transmitter release in synaptosomes. *Brain Research* 250 :291-299.
10. Yeh, J. Z., G.S. Oxford, C.H. Wu y T.Narahashi. 1976. Dynamics of aminopyridines block of potassium channels of squid axon membrane. *J. Gen. Physiol.* 68 :519-535.
11. Lundh, H. y S. Thesleff, 1977. The mode of action of 4-aminopyridine and guanidine on transmitter release from motor nerve terminals. *Eur. J. Pharmacol.* : 411-412
12. Schramm, M., Thomas, G., Towart, R. y Franckowiak, G. 1983. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 303 :535-539.
13. Schramm, M., Bechem, M., Franckowiak, G., Thomas, G. y Towart, R. 1986. Calcium antagonist and calcium agonist drug. Ion channels in Neural Membranes. In *Neurology and Neurobiology*. 20. Alan. R. Liss, New York. pp 213-225.
14. Takahashi, M., M.J. Seagar, J.F. Jones, B.F.X. Reber, y W. A. Catterall, 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5478-5482.
15. Tanabe, T., K.G. Beam, J. A. Powell y S. Numa. 1988. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 336: pp 134-139.
16. Takahashi, M. y W. A. Catterall. 1987. Identification of an  $\alpha$ -subunit of dihydropyridine-sensitive brain calcium channels. *Science* 236:88-91.
17. Gould, R.J., K.M.M. Murphy y S. H. Snyder. 1982. <sup>3</sup>H-Nitrendipine-labeled calcium channels discriminate inorganic calcium agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 :3656-3660.
18. Massieu, L. y Tapia, R. 1988. Relationship of dihydropyridine binding sites with calcium dependent neurotransmitter release in synaptosomes. *J. Neurochem.* 51 : 1184-1189.
19. Hess, P., A.P. Fox, J.B. Lansman, B. Nilius, M.C. Norwycky, y R. W. Tsien, 1986. Calcium channel types in cardiac, neuronal and smooth muscle-derived cells: differences in gating permeation and pharmacology. Ion Channels in Neural Membranes. In *Neurology and Neurobiology* 20. Alan R. Liss. New York. pp 227-252.
20. Meleskey, E.W., A.P. Fox, D.H. Feldam, L.J. Cruz, B.M. Olivera, y R. W. Tsien. 1987. w-conotoxina: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :4327-4331.
21. Reynolds, J.J., J.A. Wagner, S.H. Snyder, S.A. Thayer, B.M. Olivera, y R. Miller. 1986. Brain voltage-sensitive calcium channel subtypes differentiated by w-conotoxin GVIA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 :5478-5482.
22. Miller, R.J. 1987. Multiple calcium channels and neuronal function. *Science* 235 :46-52.
23. Pumain, R., I. Kurcewicz, y J. Louvel. 1983. Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes. *Science* 222 : 177-179.
24. Meyer, F.B. y T. M. Sundt. 1986. Selective central nervous system calcium channel blockers-a new class of anticonvulsant agents. *Mayo Clin. Proc* 61 :239-247.
25. Shelton, R.C., J.A. Grebb y T. W. Freed. 1987. Induction of seizures in mice by intracerebroventricular administration of the calcium channel BAY K 8644. *Brain Res.* 402 :399-402.

