

CANALES DE CALCIO VOLTAJES DEPENDIENTES

IZAGUIRRE, V. y ZAVALETA, A. I.

Departamento de Farmacología, Bromatología y Toxicología. U.N.M.S.M.

La vía más importante para la entrada de Ca^{2+} en las células excitables (células musculares, neuronas y células de glándulas neuroendocrinas) son los canales de Ca^{2+} voltajes dependientes. Al abrirse, permiten el flujo selectivo de iones Ca^{2+} a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas, etc. De esta forma, los canales de Ca^{2+} constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares. Debido al papel que juegan en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, en este trabajo se revisan aspectos relacionados con la estructura, clasificación, biología molecular y las propiedades biofísicas y farmacológicas de los canales de calcio voltajes dependientes.

ESTRUCTURA

Los canales de calcio son proteínas oligoméricas, constituidos por una subunidad principal, α_1 , que sirve como poro y sensor del cambio de potencial (Catterall, 1991) y diversas subunidades reguladoras o auxiliares tales como la subunidad β , las subunidades $\alpha_2\sigma$ (unidas por puentes disulfuro) y dependiendo del tejido, una quinta subunidad, la subunidad y del músculo esquelético o la subunidad neuronal p95 pueden también formar parte del canal (Birnbaumer y col., 1994). con un tamaño aproximado de 2000 aminoácidos, la subunidad α_1 tiene la misma estructura general que los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Tsien y col., 1991); está constituida por 4 dominios, los que a su vez están formados por 6 segmentos transmembrana. El cuarto de estos segmentos, S4, está altamente cargado y se considera que es la zona que actúa como sensor de los cambios de potencial de la membrana. El asa ("loop") que une el quinto y sexto segmento formaría también parte del poro del canal (McCleskey, 1994) (Fig. 1).

CLASIFICACIÓN

Se han descrito seis tipos funcionales de canales de Ca^{2+} (Zhang y col., 1993), denominados T, L, N, P, Q y R. Estos canales se pueden clasificar atendiendo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas; sin embargo, la clasificación más utilizada se basa en el rango de voltaje necesario para su activación, clasificándolos en dos categorías: canales de Ca^{2+} de bajo y de alto umbral. El canal de tipo T es el único canal de Ca^{2+} de bajo umbral descrito hasta la actualidad, mientras que los canales de tipo L, N, P, Q y R han sido caracterizados como canales de Ca^{2+} de alto umbral debido a que se requieren grandes despolarizaciones para su activación.

PROPIEDADES BIOFÍSICAS Y FARMACOLÓGICAS

– Canales de calcio Tipo T

Descritos originalmente en neuronas sensoriales de vertebrados (Carbone y Lux, 1984), los canales de Ca^{2+} tipo T han sido encontrados en una gran variedad de células

excitables y no excitables (neuronas, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético durante el desarrollo, fibroblastos, osteoblastos, astrocitos, pituitaria, etc.) y se encuentran ausentes en células cromafines y en neuronas simpáticas. Su función está relacionada principalmente con la actividad rítmica (marcapasos) y la entrada de Ca^{2+} a potenciales negativos (Bean, 1985). Se activan de forma voltaje dependiente a potenciales negativos (-70 mV), observándose la amplitud máxima de la corriente alrededor de -20 mV (Fedulova y col., 1985; Bossu y col., 1985); el curso temporal de la activación se representa por una sigmoide, lo cual sugiere la existencia de varios estados cerrados con un estado final abierto (Carbone y Swandulla, 1989). Por otra parte, inactivan (se cierran durante la despolarización) de forma voltaje dependiente, deactivan (se cierran durante la repolarización) más lentamente que los canales L y N. Las corrientes de cola se ajustan a una función monoexponencial con una constante de tiempo en el rango de milisegundo (Fedulova y col., 1985; Bossu y col., 1985).

Los canales de tipo T son bloqueados, aunque de forma no selectiva, por amilorida (Tang y col., 1988), tetrametrina (Hagiwara y col., 1988), difenilhidantoina (Yaari y col., 1987) y octanol (Llinás & Yarom, 1986) y son resistentes a las dihidropiridinas. Son insensibles a los iones Cd^{2+} , inclusive a concentraciones elevadas ($20 \mu\text{M}$); y, son bloqueados de forma selectiva por los iones Ni^{2+} ($40 \mu\text{M}$), sin afectar las corrientes de alto umbral (Fox y col., 1987a y b).

– Canales de calcio tipo L

Los canales de Ca^{2+} de tipo L son los mejores estudiados y se encuentran ampliamente distribuidos en todas las células excitables y en la mayoría de las células no excitables. Constituyen la principal vía de entrada de iones Ca^{2+} en las células de los músculos cardíaco, esquelético y liso, y, contribuyen de forma significativa a controlar la secreción de neurotransmisores y los mecanismos de acoplamiento excitación-contracción en las células neuroendocrinas, en algunas preparaciones neuronales y en las células de los músculos cardíaco y esquelético. Su activación es voltaje dependiente y el potencial de activación depende del tipo celular; por ejemplo, en las células neuroendocrinas y en el músculo cardíaco se activan a partir de potenciales próximos a -30 mV y la amplitud máxima de la corriente se alcanza en torno a los $+5$ mV (Bean, 1985) mientras que, en neuronas sensoriales se activan alrededor de -10 mV (fox y col., 1987a y b). La inactivación es más lenta que los canales de tipo T y en el curso temporal de dicho proceso tiene una constante de tiempo del orden de segundos y depende de diversos factores: 1) del ion que pasa a través del canal (los iones Ca^{2+} la aceleran y los iones Ba^{2+} la enlentecen), 2) de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (los quelantes de Ca^{2+} la enlentecen) y 3) de la amplitud de la corriente (cuanto mayor es la amplitud de la corriente, más rápida es la inactivación). Estos datos sugieren que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desempeña un papel fundamental en el proceso de inactivación de los canales de Ca^{2+} de tipo L y en general de todos los canales de alto umbral; sin embargo, en células cardíacas se ha observado que la inactivación también depende del potencial de membrana (Lee y col., 1985). Por tanto, la inactivación de los canales de Ca^{2+} de alto umbral es un fenómeno complejo que depende al menos de dos factores: de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que a su vez depende de la actividad de los canales; y, del potencial que alcanza la membrana durante su activación.

La farmacología de este tipo de canales es de gran importancia debido al éxito alcanzado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (ángor pectoris, hiper-

tensión arterial, enfermedades vasculares periféricas, etc.), neurológicas (vasoespamo, isquemia cerebral, infarto cerebral agudo, migraña, etc.), gastrointestinales, etc. (Fisher y Grotta, 1993) con fármacos bloqueantes de los canales de Ca^{2+} de tipo L., denominados usualmente "antagonistas del calcio" (Fleckenstein-Grün y col., 1984). Estos fármacos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos y han sido clasificados atendiendo a su estructura química en 4 grupos: 1,4-dihidropiridinas (DHP) (nifedipina, nitrendipina, nimodipina, etc.), benzotiazepinas (diltiazem), fenilalquilaminas (verapamil) y piperacinas (flunaricina, cinaricina, etc.). Se unen específicamente a receptores acoplados alostéricamente a la subunidad α , del canal, pero esta unión esta modulada por los estados (activo, inactivo) del mismo; teniendo mayor afinidad por el estado inactivado, que es el que predomina durante la despolarización, produciendo la estabilización de este estado y por lo tanto un bloqueo voltaje dependiente de la corriente de Ca^{2+} (Bean, 1984; Porzig, 1990). Las DHP por su especificidad y potencia han sido utilizadas como ligandos para la localización, aislamiento y purificación de los canales de tipo L en músculo esquelético (Curtis y Catterall, 1984; Tanabe y col., 1987) y para los estudios de inhibición y activación de estos canales en células cromafines (Ceña y col., 1989) y otras preparaciones (Scott y Dolphin, 1990). Por parte, los canales de Ca^{2+} de tipo L son insensibles a las toxinas ω -agatoxina IVA (ω -Aga-IVA) ω -conotoxina GVIA (ω -CTx-GVIA) a concentraciones inferiores a $1 \mu\text{M}$ (Birnbaumer y col., 1994).

– Canales de calcio tipo N

Se describieron por primera vez en neuronas del ganglio dorsal del pollo (Nowycky y col., 1985). Son un grupo heterogéneo de canales que precisan grandes despolarizaciones para su activación e inactivan, aunque de forma incompleta, a potenciales de "holding" despolarizantes (positivos) (Fox y col., 1987a y b; Plummer y col., 1989). Los canales de tipo N, se denominan así porque parecen ser específicos del sistema nervioso y de tejidos relacionados con éste, puesto que sólo se han descrito en células de origen neural (Wagner y col., 1988; Boland y col., 1994), en células cromafines (Bossu y col., 1991) y se ha observado que se incrementa su expresión en células PC12 tratadas con NGF (Grantham y col., 1994). Debido a la variabilidad de la conductancia de canal único (11-20 pS), de su cinética de apertura y del curso temporal de su inactivación (50-80 ms en neuronas del ganglio dorsal del pollo ó 500 ms en neuronas simpáticas) no es posible diferenciar por métodos electrofisiológicos los canales de tipo N de otros canales de Ca^{2+} de alto umbral (Plummer y col., 1989).

Actualmente, la mejor forma de caracterizarlos es utilizando criterios farmacológicos debido a su insensibilidad a las DHP y a su bloqueo por ω -CTx-GVIA (100-500 μM) (Aosaki y Kasai, 1989; Regan y col., 1991) y por ω -conotoxina MVIIC (ω -CTx-MVIIC) (Martin-Moutot y col., 1995) a concentraciones mayores de 100 nM (Birnbaumer y col., 1994). Estas y otras conotoxinas se obtienen del veneno de caracoles marinos pertenecientes a diversas especies del género *Conus*: *C. geographus* (ω -CTx-GVIA), *C. magus* (ω -CTx-MVIIC), etc. (Gray y col., 1988). Las ω -conotoxinas son cadenas peptídicas de 24 a 29 aminoácidos, contienen 6 residuos de cisteína que forman tres puentes disulfuro y en la actualidad se han obtenido análogos sintéticos que se encuentran en fase de caracterización de sus propiedades farmacológicas y por lo

tanto de la determinación de su posible uso en el tratamiento de patologías en las que esten involucrados los canales de Ca^{2+} de tipo N (Miljanich y Ramachandran, 1995).

– Canales de calcio tipo P

Se denominan canales de tipo P porque se describieron por primera vez en las células de Purkinje del cerebelo (Llinás y col., 1991; Mintz y col., 1992a); sin embargo, su caracterización se realizó tanto en células de Purkinje como en la sinapsis gigante del calamar. Llinás y col. (1989) observaron que una corriente de Ca^{2+} resistente a DHP y a w-CTx-GVIA era bloqueada por FTX (funnel-web toxin), un compuesto de bajo peso molecular (200-400 Da) obtenido por purificación parcial del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*. Con esta toxina se purificaron los canales de Ca^{2+} (del cerebelo de cobayo y del lóbulo óptico del calamar) y, una vez reconstituidos en bicapas lipídicas, se estudiaron sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas. Observaron que los canales tenían una conductancia de 10-15 pS, que su activación era voltaje dependiente, que la corriente de Ca^{2+} era bloqueada por FTX, Cd^{2+} y Co^{2+} y que no se afectaba por otros bloqueantes de canales de Ca^{2+} . w-Aga-IVA es un péptido de 28 aminoácidos purificado a partir del veneno de *A. aperta* y debido a su potencia y selectividad es el bloqueante más utilizado para el estudio y caracterización farmacológica de los canales de tipo P (Mintz y col., 1992a y b).

Los canales de tipo P parecen ser los canales mas ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central de mamíferos, y también se ha descrito su existencia en: retina, hipófisis, células cromafines, etc. (Llinás y col., 1991). Respecto a su función, se le ha relacionado con la generación de actividad intrínseca, la modulación de la actividad neuronal y liberación de neurotransmisores (Bertolino y Llinás, 1992).

– Canales de calcio tipo Q

w-CTx-MVIIC, un péptido de 26 aminoácidos, presenta sitios de unión de alta afinidad (en el rango de 40 pM hasta 1 nM) en membranas de cerebro de rata; esta afinidad es significativamente mayor que la que presenta por los canales de tipo N (en estudios de desplazamientos de ^{125}I -w-CTx-MVIIC, se ha observado que la IC_{50} es de 0.3 nM, en tanto que para w-CTx-GVIA es de 3 μM) (Hillyard y col., 1992).

Utilizando esta toxina se ha establecido la existencia de otro tipo de canal de Ca^{2+} en neuronas granulares de cerebelo (Sather y col., 1993), en hipocampo (Wheeler y col., 1994) y recientemente en células cromafines bovinas (López y col., 1994), denominado tipo Q. Al igual que los canales de tipo P, los de tipo Q son resistentes a las DHP pero se diferencian porque presentan una menor sensibilidad a w-Aga-IVA (son bloqueados a concentraciones > 10 nM) (Zhang y col., 1993; Birnbaumer y col., 1994), tienen una cinética de inactivación más rápida y presentan una elevada sensibilidad a w-CTx-MVIIC (rango nM) (Sather y col., 1993). Respecto a su función, se ha sugerido que este tipo de canal jugaría un papel predominante en la neurotransmisión glutamatérgica debido a que tanto la transmisión sináptica como la liberación de glutamato inducida por despolarización son inhibidas por w-Aga-IVA pero sólo a elevadas concentraciones (Zhang y col., 1993; Teramoto y col., 1995). A

pesar de todas estas observaciones, la existencia de este canal es controvertida porque el efecto bloqueante de w-CTx-MVIIC es muy inespecífico (Olivera, 1994), pudiendo bloquear los canales de tipo P con una potencia similar al tipo Q y unirse a los canales de tipo N aunque con menor afinidad que w-CTx-GVIA.

– Canales de calcio tipo R

Los canales de calcio se pueden clasificar de una forma general en dos familias: canales sensibles a DHP y canales insensibles a DHP. Los miembros de la última familia tienen mucho interés porque se encuentran casi exclusivamente en tejido neuronal y entre sus distintos miembros presentan una homología > 60% (en sus secuencias de aminoácidos). A la segunda familia pertenece el cDNA que codifica para una subunidad α , conocida como doe-1, aislado de una genoteca de cerebro anterior de *Discopyge ommata* (Horne y col., 1993). La micro inyección de los RNAs complementarios de doe-1, y las subunidades α_1 y β en ovocitos de *Xenopus* produjeron una corriente de Ba^{2+} que presentaba una cinética de activación e inactivación muy rápida y los estudios de canal único demuestran que en respuesta a la despolarización, los canales doe-1 se abren repetidamente durante cortos periodos de tiempo y su conductancia a Ca^{2+} y Ba^{2+} es de 14 pS (Ellinor y col., 1993), similar a la de los canales de tipo N, mayor que la de los canales de tipo T y menor que la de los canales de tipo L en neuronas sensoriales (Fox y col., 1987b).

La corriente de Ca^{2+} observada tras la expresión de la subunidad doe-1 presenta propiedades farmacológicas distintas a las mediadas por los canales de Ca^{2+} descritos previamente. A diferencia de los canales N, es bloqueada de forma reversible por w-CTx-GVIA pero sólo a concentraciones muy elevadas (rango μM); a diferencia de los canales de tipo P, doe-1 es insensible a w-Aga-IVA y ligeramente sensible a w-CTx-MVIIC; y, a diferencia de los canales de tipo L, es insensible a las DHP pero, se ha observado que el agonista BAY K 8644 produce un débil bloqueo de la corriente en lugar de un incremento (Ellinor y col., 1993). Sin embargo, se bloquea de forma dosis dependiente y reversible por iones Ni^{2+} ($IC_{50} = 33 \mu M$) y Cd^{2+} ($IC_{50} < 1 \mu M$) (Zhang y col., 1993).

En las células granulares del cerebelo se ha descrito la existencia de un canal de Ca^{2+} de alto umbral con propiedades biofísicas y farmacológicas muy similares a las descritas para doe-1 y al que se ha denominado canal de tipo R. La gran similitud de propiedades sugiere que el canal de tipo R sería la contraparte de doe-1 en tejido neuronal de mamífero (Zhang y col., 1993).

– Biología molecular

La biología molecular de los canales de Ca^{2+} tiene su origen en la caracterización bioquímica del receptor de DHP en el músculo esquelético. Estos estudios establecieron que el complejo receptor-canal de DHP era un complejo multi-subunidad compuesto por la subunidad α (formadora del canal) y pequeñas subunidades accesorias (α_2 , β y γ) (Campbell y col., 1988). El clonaje y secuenciación de los cDNAs permitió disponer de las sondas para el descubrimiento de la diversidad de canales de Ca^{2+} que hoy conocemos. Se han identificado 5 subunidades que se han designado α_1 , α_2 , β , γ y σ ; y, se han clonado los genes para 6 subunidades α , 4 subunidades β , una subunidad

α_2 y una γ (Perez-Reyes y Schneider, 1995). Los genes de las subunidades α_1 , codifican canales de Ca^{2+} con distintas propiedades electrofisiológicas y farmacológicas por lo que los estudios de biología molecular se han centrado en el estudio de esta subunidad. Por otra parte, estas propiedades se ven afectadas tanto por el sistema de expresión como por la composición de subunidades del canal, por lo que no ha sido posible establecer una clasificación de subunidades α_1 en función de estas propiedades. Por ello, se ha establecido una clasificación de subunidades en función de los productos de los genes clonados hasta la actualidad (tablas 1 y 2).

Subunidad α_1 .— Se han aislado, clonado y secuenciado los productos de 6 genes que codifican para igual número de subunidades α_1 (Tabla 1). La subunidad α es el receptor de DHP del músculo esquelético y fue la primera subunidad α_1 que se clonó (Tanabe y col., 1987). La subunidad α_{1A} se expresa en el cerebro pero de forma particular en el cerebelo (Starr y col., 1991), es insensible a DHP y a w-CTx-GVIA y por ello se ha sugerido que formaría parte del canal de tipo P y más recientemente del canal de tipo Q. La subunidad α_{1B} se clonó a partir de la línea celular IMR32 de neuroblastoma humano (Williams y col., 1992) y presenta sitios de alta afinidad para w-CTx-GVIA, lo cual sugiere que se trata del canal de tipo N ampliamente distribuido en el sistema nervioso central. La subunidad α_{1C} es un canal de tipo L, se encuentra ampliamente distribuida y se han descrito diversas isoformas, producto del procesamiento alternativo del gen que la codifica (Mikami y col., 1989; Perez-Reyes y col., 1990; Snutch y col., 1991). La subunidad α_{1D} también es un canal de tipo L (Perez-Reyes y col., 1990) y se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y en diversas células endocrinas. La subunidad α_{1E} parece expresarse exclusivamente en el sistema nervioso central (cerebro de humanos, rata y ratón) ya que no se ha detectado su expresión en músculo esquelético, corazón, estómago o riñón (Perez-Reyes y Schneider, 1995). Es resistente a todos los bloqueantes de canales de Ca^{2+} conocidos, por lo que se ha sugerido que podría ser el canal de tipo R (Ellinor y col., 1993; Schneider y col., 1995).

Subunidad β .— Se ha descrito la existencia de 4 tipos de subunidades β (Tabla 2). El cDNA de la subunidad β_1 codifica una proteína de 58 kD a cuya estructura secundaria tiene varias α hélices que a su vez continen residuos cargados por lo que probablemente no se encuentren embebidas en los lípidos de la membrana. La secuencia de aminoácidos deducida contiene secuencias hidrofóbicas, al menos dos secuencias ricas en prolina, glutamina, serina y treonina y secuencias de consenso para muchas kinasas (Ruth y col., 1989). Se ha observado que el gen que codifica para la subunidad β_1 en músculo esquelético, cerebro y corazón, es procesado alternativamente en la región central y en el extremo carboxi terminal para producir al menos 3 proteínas completas (β_{1a} , β_{1b} y β_{1c}). La subunidad β_2 se expresa en cerebro, corazón y pulmón; donde se han identificado transcritos diferentes de 3.5, 4 y 6 kb (Pérez-Reyes y col., 1992). Esta heterogeneidad de tamaños podría deberse al procesamiento alternativo del gen en la región central y a diferencia de la subunidad β_1 , no se ha detectado procesamiento alternativo en el extremo carboxilo (Perez-Reyes y Schneider, 1995).

La subunidad β_3 se expresa principalmente en el cerebro, pero se han detectado bajos niveles de expresión en corazón, aorta, tráquea, pulmón, y las líneas celulares

HIT y RIN de células β (Hullin y col., 1992; Castellano y col., 1993). No contiene sitios de fosforilación por PKA y a diferencia de las subunidades β_1 y β_2 , no se han descrito productos debidos a procesamiento alternativo del gen (Perez-Reyes y Schneider, 1995). La **subunidad** β_4 es una proteína de 58 kDa cuya secuencia contiene regiones con alta similitud de secuencia con los otros tipos de subunidades β , siendo el extremo carboxilo el que presenta mayor divergencia, y, al igual que la subunidad β_3 , no presenta sitios de fosforilación por PKA y tampoco se ha descrito la existencia de procesamiento alternativo (Perez-Reyes y Schneider, 1995).

Respecto a su función, se ha observado que todas las subunidades β incrementan la actividad de la subunidad α_1 , alteran su sensibilidad al voltaje y su cinética (usualmente aceleran tanto la activación como la inactivación). No se conocen los mecanismos mediante los cuales las subunidades β modulan la actividad de las diferentes subunidades α_1 , pero, la región a través de la cual interactúan parece estar muy conservada (Pragnell y col., 1994).

Subunidad α_2 .— Es una glicoproteína fácil de identificar debido a que incrementa su movilidad en geles de SDS-PAGE después del tratamiento con agentes reductores de grupos sulfhidrilos. Esta disminución aparente en su masa, de 165-225 kDa a 130-150 kDa, después de la reducción de los grupos sulfhidrilo, se debe a la disociación de una proteína de 23-33 kDa denominada **subunidad** δ (Takahashi y col., 1987). Ambas subunidades han sido clonadas y secuenciadas, y la comparación de sus secuencias ha demostrado que son codificadas por el mismo gen (De Jongh y col., 1990). Mediante análisis de Northern blot se han detectado transcritos de 7 y 8 kb para el RNAm de $\alpha_2\delta$ y también se ha observado la expresión de estos RNAm en músculo esquelético, corazón, aorta, pulmón, íleo y cerebro (Biel y col., 1991). Además, se han identificado subtipos del complejo $\alpha_2\delta$, los cuales serían productos de procesamiento alternativo. La coexpresión de α_{2s} con $\alpha_1\delta$ parece aumentar la expresión de α_1 , especialmente, en presencia de subunidades β . Esto sugiere que $\alpha_2\delta$ puede ser importante en la determinación de la distribución de los canales de Ca^{2+} (Perez-Reyes y Schneider, 1995). Por otra parte, parece ser que todos los canales de Ca^{2+} contienen las subunidades $\alpha_2\delta$, sin embargo, esto sólo se ha comprobado bioquímicamente para los canales de tipo N (Witcher y col., 1993) y L de músculo esquelético (Tanabe y col., 1987) y cardiaco (Chang y Hosey, 1988).

Subunidad γ .— Es una glicoproteína y ha sido purificada formando un complejo con el receptor de DHP (Curtis & Catterall, 1984). Con la información de su secuencia se han diseñado oligonucleótidos con los que se ha clonado su cDNA a partir de genotecas de cDNA de músculo esquelético (Bosse y col., 1990). La secuencia de aminoácidos deducida codifica una proteína de 25 kDa que contiene 4 segmentos transmembrana. El análisis de Northern blot muestra que su expresión es casi exclusiva en el músculo esquelético (Bosse y col., 1990), sin embargo, transcritos de tamaño similar han sido detectados en pulmón y aorta (Biel y col., 1991). Mediante estudios de PCR se ha confirmado esta distribución restringida. Aún no se ha determinado su función, pero su expresión restringida en el músculo esquelético sugiere que podría jugar un papel importante en el acoplamiento excitación-contracción.

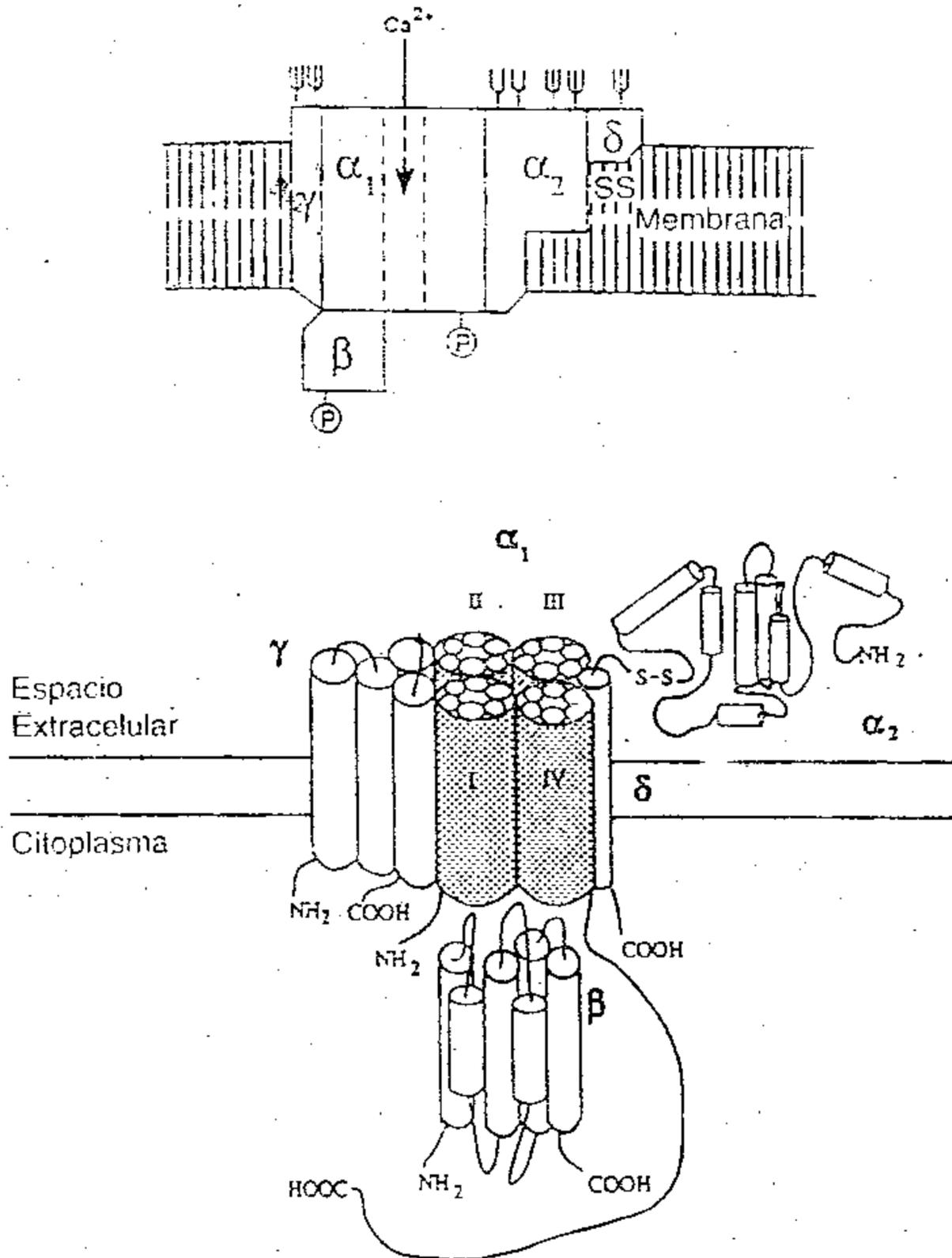


Figura 1.- Estructura hipotética de los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes. A. Distribución espacial de las subunidades que conforman los canales de Ca^{2+} (α_1 , α_2 , β , γ y δ). Sitios de fosforilación (P) y sitios de glicosilación (ψ). **B.** Modelo tridimensional de los canales de calcio. La subunidad α_1 (formadora del poro selectivo para iones Ca^{2+}) posee cuatro dominios (I, II, III y IV), los cuales a su vez están formados por 6 segmentos transmembrana. Las subunidades α_2 y β son proteínas hidrofílicas localizadas en el espacio extra- e intracelular respectivamente, mientras que las subunidades γ y δ son proteínas transmembrana altamente lipofílicas. Las subunidades α_2 y δ están unidas por puentes disulfuro (-S-S-). Catterall, 1988 y Krizanova y col., 1993.

Tabla 1. Genes de las subunidades α_1 de canales de Ca^{2+} de alto umbral clonados a partir de tejidos de mamíferos (*)

Gen: nombre de consenso	Nombre original	Tipo de canal	Localización cromosomal	Sitios de expresión (◆)
α_{1s}	m.esquelético CaCh1 α_{1s} km	L	1q32 (humano)	m.esquelético BC3H1
α_{1A}	Bi CaCh4 rbA	Q ? P ?	N d	Cerebro, cerebelo, riñón, células C y PC12.
α_{1B}	BIII CaCh5 rbB	N	2, banda A (ratón)	Cerebro, neuronas periféricas, células C y PC12
α_{1C}	Cardiaco m.liso/pulmón CaCh2 rbc	L	12o13,3 (humano)	Cirazpibm células HIT, GH3, C y PC12, cerebro, aorta, pulmón, riñón, fibroblastos
α_{1C-a}	CaCh2a CaCh2-I			Corazón
α_{1C-b}	CaCh2b CaCh2-II			m. liso, pulmón
α_{1C-c}	rb c CaCh2-III			Cerebro
α_{1D}	CaCh3 Neuroendocrino rbD	L	3o14,3 (humano) 14 (ratón)	Cerebro, páncreas, Células HIT, PC12, C, CH3
α_{1E}	CaCh6 BII rbE	R ?	Nd	Cerebro, corazón, células C

* Modificado de Birbaumer y col., 1994; ◆ , no se descartan otros sitios de expresión; Nd, no determinado

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOSAKI, T. & KASAI, H. (1989). Characterization of two kinds of high-voltage-activated calcium-channel currents in chick sensory neurons. differential sensitivity to dihydropyridines and omega-conotoxin GVIA. *Pflüger Arch.* **414**, 150-156.
- BEAN, B. P., NOWYCKY, M. C. & TSIEN, R. W. (1984). Beta-Adrenergic modulations in frog ventricular heart cells. *Nature* **307**(5949), 371-375.
- BEAN, B. P. (1985). Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. *J. Gen. Physiol.* **86**, 1-30.
- BERTOLINO, M. & LLINAS, R. R. (1992). The central role of voltage-activated and receptor-operated calcium channels in neuronal cells. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**, 399-421.
- BIEL, M., HULLIN, R., FREUNDNER, S., SINGER, D., DASCAL, N., FLOCKERZI, V. & TSIEN, R. W. (1994). The Naming of voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron* **13**, 505-506.
- BOLAND, M. L.K, MORRILL, J. A. & BEAN, B.P. (1994). Omega-conotoxin block of N-type calcium

Tabla 2. Genes de las subunidades α_1/δ , β y γ de los canales de Ca^{2+} de alto umbral (*)

Gen: nombre de consenso	Splicing alternativo	Otros nombres	Forma parte de	Localización cromosomal	Sitios de expresión (◆)
α_{1s}/δ	α_{2a}/δ α_{2b}/δ α_{2c}/δ α_{2d}/δ α_{2e}/δ			7q21-122 (humano) 5 (ratón)	m.e., corazón, cerebro, aorta Cerebro Cerebro, aorta Nd Nd
β_1	β_{1a} β_{1b} β_{1c}	β_{1M} β_{1B2}, β_2 β_{1B1}	R. de DHP ? ?	17q21-22 (humano)	m.e. Cerebro, corazón, m.e. Cerebro, corazón, m.e.
β_2	β_{2a} β_{2b} β_{2c}	β_3	? ? ?	Nd	Cerebro, corazón, aorta Cerebro, corazón Cerebro, corazón
β_3	?		R. de ω -conotoxin a ?	12q13 (humano)	Cerebro, corazón, aorta
β_4	β_{4a} β_{4b}		?	Nd	Cerebro
γ	?			17q24 (humano)	m.e.

* Modificado de Birnbaumer y col., 1994; ◆, no se descartan otros sitios de expresión; Nd, no determinado; R, receptor; m.e., músculo esquelético.

channels in frog and rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 14, 5011-5027.

BOSSE, E., REGULLA, S., BIEL, M., RUTH, P., MEYER, H. E., FLOCKERZI, V. & HOFMANN, F. (1990). The cDNA and deduced amino acid sequence of the gamma subunit of the L-type calcium channel from rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.* 267, 153-156.

BOSSU, J. L., FELTZ, A. & THOMANN, J. M. (1985). Depolarization elicits two distinct calcium currents in vertebrate sensory neurones. *Pflügers Arch.* 403, 360-368.

BOSSU, J. L., DE WAARDS, M. & FELTZ, A. (1991). Two types of calcium channels are expressed in adult bovine chromaffin cells. *J. Physiol.* 437, 621-634.

CAMPBELL, K. P., LEUNG, A. T. & SHARP, A. H. (1988). T. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* 11(10), 425-430.

CARBONE, E., LUX, H. D. (1984). A low voltage activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310, 501-511.

CARBONE, E., & Aswadulla, D. (1989). Neuronal calcium channels: Kinetics, Blockade and modulation. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 54, 31-58.

CASTELLANO, A., WEI, X., BIRNBAUMER, L. & PÉRES-REYES, E. (1993). Cloning and Expression of a Third Calcium Channel Beta Subunit. *J. Biol. Chem.* 268(5), 3450-3455. Sensitive Ion Channels. *Science*

242, 50-61.

- CATTERAL, W. A. (1988). Structure and Function of Voltage-Sensitive Ion Channels. *Science* **242**, 50-61.
- CATTERALL, W. A. (1991). Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium channels. *Science* **253**, 1499-1500.
- CEÑA, V., STUTZIN, A. & ROJAS, E. (1989). Effects of Calcium and Bay K-8644 on Calcium Currents in Adrenal Medullary Chromaffin Cells. *J. Memb. Biol.* **112**, 255-265.
- CHANG, F. C. & HOSEY, M. M. (1988). Dihydropyridine and Phenylalkylamine Receptors Associated with Cardiac and Skeletal Muscle Calcium Channels Are Astructurally Different. *J. Biol. Chem.* **263(35)**, 18929-18937.
- CURTIS, B. M. & CATERAKK W, A, (1984). Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry* **23(10)**, 2113-2117.
- DE JONGH, K. S., WARNER, C. & CATTERALL, W. A. (1990). Subunits of purified calcium channels. *J. Biol. Chem.* **265(25)**, 14738-14741.
- ELLINOR, P. T., ZHANG, J. F., RANDALL, A. D., ZHOU, M., SCHWARZ, T. L., TSIEN, R. W. & HORNE, W. A. (1993). Functional expression of a rapidly inactivating neuronal calcium channel. *Nature* **363**, 455-458.
- FEDULOVA, S. A. KOSTYUK, P. G. & VESELOVSKY, N. S. (1985). Two types of calcium channels in the somatic membrane of new-born rat dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* **350**, 431-446.
- FISHER, M. & GROTTA, J. (1993). New Uses for Calcium Channel Blockers. Therapeutic Implications. *Drugs* **46(6)**: 961-975.
- FLECKENSTEIN-GRÜN, G., GFREY, M. & FLECKENSTEIN, a. (1984). Calcium antagonist: mechanisms and therapeutic uses. *Trends Pharmacol. Sci.* 283-286.
- FOX, A. P., NOWYCKY, M. C. & TSIEN, R. W. (1987a). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* **394**, 149-172.
- FOX, A. P., NOWYCKY, M. C. & TSIEN, R. W. (197b). Singel-channels recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J. Cphysiol.* **394**, 173-200.
- GRANTHAM, C. J., MAIN, M. J. & CANNELL, M. B. (1994). Fluspirilene block of N-type calcium current in NGF-differentiated PC12 cells. *Br. J. Pharmacol.* **111**, 483-488.
- GRAY, W. R., OLIVERA, B. M. & CRUZ, L. J. (1988). Peptide toxins from venomous conus snails. *Ann. Rev. Biocheem.* **57**, 665-700.
- HAGIWARA, N., IRISAWA, H. & KAMEYAMA, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* **395**, 233-253.
- HILLYARD, D. R., MONJE, V. D., MINTZ, I. M., BEAN, B. P., NADASDI, L., RAMACHANDRAN, J., MILJANICH, G., AZIMI-ZOONOOZ, A., MCLINTOSH, M. M., CRUZ, L. J., IMPERIAL, J. S. & OLIVERA, B. M. (1992). A New Conus Peptide Ligand for Mammalian Presynaptic Calcium Channels. *Neuron* **9**, 69-77.
- HORNE W. A., ELLINOR, P. T., INMAN, I., ZHOU, M., TSIEN, R. W. & SCHWARZ, T. L. (1993). Molecular diversity of Ca²⁺ channel α 1 subunits from the marine ray *Discopyge ommata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 3787-3791.
- HULLIN, R., SINGER-LAHAT, D., FREICHEL, M., BIEL, M., DASCAL, N., HOFMANN, F. & FLOCKERZI, V. (1992). Calcium channel beta subunit heterogeneity: Functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* **11**, 885-890.
- KRIZANOVA, O., DIEBOLD, R., LORY, P. & SCHWARTZ, A. (1993). Molecular aspects and diversity of voltage-dependent calcium channels. *Circulation* **87 (Suppl. VII)**. VII-44-VII-48.
- LEE, K. S., MARBAN, E. & TSIEN, R. W. (1985). Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J. Physiol.* **364**, 395-411.
- LLINAS, R., & YAROM, Y. (1986). Specific blockade of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols. *Soc. Neurosci. Abstr.* **12**, 174 (Abstr).
- LLINAS, R., SUGIMORI, M., LIN, J. W. & CHERKSEY, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1689-1693.
- LLINAS, R. R., SUGIMORI, M., ILLMAN, D. E. & CHERKSEY, B. (1991). Distribution and functional

Significance of the P-type voltage-dependent calcium channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* **15**(9), 351-355.

LOPEZ, M. G., VILLARROYA, M., LARA, B., SIERRA, R. M., ALBILLOS, A., GARCIA, A. G. & GANDIA L. (1994). Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* **349**, 331-337.

MARTIN-MOUTOT, N., LEVEQUE, C., STO, K., KATO, R., TAKAHASHI, M. & SEAGAR, M. (1995). Properties of omega conotoxin MVIIIC receptors associated with α_{1A} calcium channel subunits in rat brain. *FEBS Lett.* **366**, 21-25.

McCLESKEY, E. W. (1994). Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 304-312.

MIKAMI, a., IMOTO, K., TANABE, T., NIIDOME, T., MORI, Y., TAKESHIMA, H., NARUMIYA, S.; & NUMA, S. (1989). Primary structure and functional expressions of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-236.

MILJANICH, G. P. & RAMACHANDRAN, J. (1995). Antagonists of neuronal calcium: Structure, Function, and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 707-734.

MINTZ, I. M., ADAMS, M. E. & BEAN, B. P. (1992a). P-Type Calcium Channels in Rat Central and Peripheral Neurons. *Neuron* **9**, 85-95.

MINTZ, I. M., VENEMA, V. J., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., BEAN, B. P. & AADAMS, M. E. (1992b). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA. *Nature* **355**, 827-829.

NOWYCKY, M. C., FOX, A. P. & TSIEN, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium antagonist sensitivity. *Nature* **316**, 440-443.

OLIVERA, B. M. (1994). Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 823-867.

PEREZ-REYES, E., WEI, X., CASTELLANO, A. & BIRNBAUMER, L. (1990). Molecular Diversity of L-Type Calcium Channels. *J. Biol. Chem.* **265**, 20430-20436.

PEREZ-REYES, E., CASTELLANO, A., KIM, H. S., BERTRAND, P., BAGGSTROM, E., LACERDA, A. E., WEI, X. & BIRNBAUMER, L. (1992). Cloning and Expression of a Cardiac/brain Beta Subunit of the L-type Calcium Channel. *J. Biol. Chem.* **267**(3), 1792, 1797.

PEREZ-REYES, E. & SCHNEUDER, T. (1995). Molecular biology of calcium channels. *Kidney International* **48**, 1111-1124.

PLUMMER, M. R., LOGOTHETIS, D. E. & HESS, P. (1989). Elementary Properties and Pharmacological Sensitivities of Calcium Channels in Mammalian Peripheral Neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.

PORZIG, H. (1990). Pharmacological Modulation of Voltage-Dependent Calcium Channels in Intact Cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **114**, 209-262.

PRAGNELL, M., DE WAARD, M., MORI, Y., TANABE, T., SNUTCH, T.P. & CAMPBELL, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* **368**, 67-70.

REGAN, L. J., SAH, D. W. Y. & BEAN, B. P. (1991). Calcium Channels in Rat Central and Peripheral Neurons. High-Threshold Current Resistant to Dihydropyridine Blockers and Omega-Conotoxin. *Neuron* **6**, 269-280.

RUTH, P., ROHRKASTEN, A., BIEL, M., BOSSE, E., REGULLA, S., MEYER, H.E., FLOCKERZI, V. & HOFMANN, F. (1989). Primary structure of beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **245**, 1115-1118.

SATHER, W. A., TANABE, T., ZHANG, J. F., MORI, Y., ADAMS, M. E. & TSIEN, R. W. (1993). Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron* **11**, 291-303.

SCHNEIDER, T., WEI, X., OLCESE, R., COSTANTINO, J. L., NEELY, A., PALADE, P., PEREZ-REYES, E., QING, N., ZHOU, J., CRAWFORD, G. D., SMITH, R. G., APPEL, S. H., STEFANI, E. & BIRNBAUMER, L. (1995). Molecular analysis and functional expression of the human type E $\alpha 1$ subunit. *Receptors and Channels* **2**, 255-270.

SCOTT, R. H. & DOLPING, A. C. (1990). Voltage-dependent modulation of rat sensory neurone calcium channel currents by G protein activation: effect of a dihydropyridine antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **99**, 629-

630.

SNUTCH, T. P., TOMLINSON, W. J., LEONARD, J. P. & GILBERT, M. M. (1991). Distinct Calcium Channels Are Generated by Alternative Splicing and Are Differentially Expressed in the Mammalian CNS. *Neuron* 45-57.

STARR, T. V. B., PRYSTAY, W. & SNUTCH, T. P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5621-5625.

TAKAHASHI, M., SEAGAR, M. J., JONES, J. F., REBER, B. F. X & CATERRALL, W. C. (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5478-5482.

TANABE, T., TAKESHIMA, H., MIKAMI, A., FLOCKERZI, V., TAKAHASHI, H., KANGAWA, K., KOJIMA, M., MATSUO, H., HIROSE, T. & NUMA, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.

TANG, C. M., PRESSER, F. & MORAD, M. (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240, 213-215.

TERAMOTO, T., NIDOME, T., MIYAGAWA, T., NISHIZAWA, K., & SAWADA, K. (1995). Two types of calcium channels sensitive to ω -agatoxin-TK in cultured rat hippocampal neurones. *Neuro Report* 6, 1684-1688.

TSIEN, R. W., ELLINOR, P. T. & HORNE, W. A. (1991). Molecular diversity of voltage-dependent calcium channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 349-354.

WAGNER, J. A., SNOWMAN, A. M., BISWAS, A., OLIVERA, B. M. & SNYDER, S. H. (1988). Omega-conotoxin GVIA binding to a high-affinity receptor in brain: characterization, calcium sensitivity, and solubilization. *J. Neurosci.* 8(9), 3354-3359.

WHEELER, D. B., RANDALL, A. & TSIEN, R. W. (1994). Roles of N-types and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107-111.

WILLIAMS, M. E., BRUST, P. F., FELDMAN, D. H., PATTHI, S., SIMERSON, S., MARQUFI, A., MCCUE GÖNÜLL VELİÇELEBI, A. F., ELLIS, S. B. & HARPOLD, M. M. (1992). Structure and Functional Expression of an Omega-Conotoxin-Sensitive Human N-Type Calcium Channels. *Science* 257, 389-395.

WITCHER, D. R., DE WAARD, M., SAKAMOTO, J., FRANZINI-ARMSTRONG, C., PRAGNELL, M., KAHL, S. D. & CAMPBELL, K. P. (1993). Subunit identification and reconstitution of the N-type Ca^{2+} channel complex purified from brain. *Science* 261, 486-489.

YAARI, Y., HAMON, B. & LUX, H. D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235, 680-682.

ZHANG, J. F., RANDALL, A. D., ELLINOR, P. T., HORNE, W. A., SATHER, W. A., TANABE, T., SCHWARZ, T. L. & TSIEN, R. W. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca^{2+} channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32(11), 1075-1088.

“Para todas las críticas veo una sola respuesta: seguir trabajando”

EMERSON