

## LA SEÑAL BIOQUÍMICA DE CALCIO

### The biochemical calcium signal

F. Fernández-Belda, F. Plenge-Tellechea, I. Fortea y F. Soler

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 30071 Espinardo, Murcia, España.

#### RESUMEN

Cuando se hace referencia al calcio surge de inmediato su relación con los dientes y los huesos. También es posible que se le relacione con el potencial de acción cardíaco o con las acciones de la vitamina D y la hormona paratiroidea. Sin embargo, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una función bioquímica mucho más sutil que está relacionada con la activación intracelular de diferentes procesos. En este caso, la llegada a la célula de un determinado estímulo **externo** (físico, químico o eléctrico) da lugar a una elevación temporal del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma (señal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y eso origina una respuesta en el **interior** de la célula. Se dice que el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una función como regulador intracelular. El mecanismo de la contracción muscular ilustra esta importante función del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

*Palabras clave:* calcio, transporte de calcio, regulación intracelular, contracción muscular.

#### SUMMARY

When we refer to calcium, everyone can establish a relationship with teeth and bones. It can be also related with the cardiac action potential or even with the action of vitamin D and the parathyroid hormone. Nevertheless, the  $\text{Ca}^{2+}$  ion plays a much more subtle biochemical function related with activation of intracellular processes. In this case, the arrival of an external stimulus (physical, chemical or electrical) to the cell induces a transient increase in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  (the  $\text{Ca}^{2+}$  signal) giving rise to different intracellular responses. Therefore,  $\text{Ca}^{2+}$  has a role as intracellular regulator. The mechanism of muscle contraction illustrates this essential function of  $\text{Ca}^{2+}$  inside the cell.

#### Regulación intracelular de $\text{Ca}^{2+}$

El primero en advertir el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la actividad celular fue Sidney Ringer

(1835-1910). Mediante experimentos in vitro constató la necesidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de incubación para observar el latido de un corazón aislado. Procesos tan diversos como: con-

tracción muscular, liberación de **neurotransmisores**, división celular, visión, etc. dependen de una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El ión  $\text{Ca}^{2+}$  es una de las señales bioquímicas más importantes que intervienen en el control de la actividad celular (TSIEN y TSIEN, 1990; BERRIDGE, 1993; POZZAN y col., 1994). Su participación se ha podido demostrar en todo tipo de células desde las más sencillas, las procarióticas, hasta las eucarióticas más especializadas como son las neuronas (GHOSH y GREENBERG, 1995). Una característica habitual en la generación de señales bioquímicas es que la síntesis y degradación de las moléculas reguladoras estén controladas por sistemas enzimáticos. Esto permite a la célula ajustar en cada momento los niveles de regulador que necesita. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , que no es un metabolito sino un ión, no se puede regular de esa forma. El control de su concentración en el citoplasma exige un complejo dispositivo de moléculas que se encargan de su unión y transporte. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citoplasma cuando la célula está en reposo es de  $\sim 100$  nanomolar, mientras que en el medio extracelular alcanza un valor próximo a 2 milimolar. Ese importante gradiente de concentración **permite** que el  $\text{Ca}^{2+}$  pueda actuar como señal.

Para que una molécula o ión actúe como señal intracelular es necesario que su concentración pueda variar al menos un orden de magnitud y que tenga capacidad para unirse con gran afinidad a moléculas diana (habitualmente proteínas). El  $\text{Ca}^{2+}$  es, de todos los iones presentes en medios biológicos, el más adecuado para cumplir funciones de regulación dadas sus características de radio iónico y carga eléctrica. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  se puede unir fuerte y **selectivamente** a proteínas debido a su capacidad de coordinación con átomos de oxígeno de glutamato,

aspartato, glutamina y asparragina (KRETSINGER, 1980). Su unión a proteínas puede inducir cambios conformacionales de gran magnitud que actúan como señales de **regulación**. Los centros de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  no se pueden predecir analizando la estructura primaria de una proteína porque no son todos iguales (McPHALEN y col., 1991). No obstante, hay un motivo estructural denominado hélice-lazo-hélice, también llamado *mano* EF, que es un tipo de centro de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  que aparece en muchas proteínas implicadas en la unión/control del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este tipo de centro se encuentra en las proteínas: **parvalbúmina**, troponina C y calmodulina.

El coeficiente de difusión del  $\text{Ca}^{2+}$  en medio acuoso es de  $\sim 1000 \mu\text{m}^2/\text{s}$  mientras que en extractos citoplásmicos de oocitos de *Xenopus laevis* es de  $\sim 35 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (ALLBRITTON y col., 1992). Esta diferencia se debe a la alta viscosidad del medio intracelular y a la presencia de proteínas con alta afinidad y especificidad para unir  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir del coeficiente de difusión se puede calcular el radio de acción y así se ve que un ión  $\text{Ca}^{2+}$  no puede migrar más de  $0,1-0,5 \mu\text{m}$  antes de unirse a alguna proteína. Esto equivale a  $\sim 50 \mu\text{s}$  en unidades de tiempo. Si estos valores se comparan con los del regulador intracelular inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) cuyo radio de acción es  $\sim 24 \mu\text{m}$  podemos concluir que el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  es muy local y restringido a ciertos dominios mientras que el efecto de  $\text{IP}_3$  se puede producir en dominios más amplios del citoplasma. Estos datos confirman que el medio intracelular no es un espacio uniforme con respecto a la distribución del  $\text{Ca}^{2+}$ . Las concentraciones más altas se suelen encontrar en zonas donde hay proteínas con capacidad para unir  $\text{Ca}^{2+}$ . En unos casos se trata de puntos estáticos mientras que en otros son zonas móviles que cambian su localización con el tiempo.

La microscopía confocal de barrido ha per-

mitido estudiar la naturaleza de la señal de  $Ca^{2+}$ . Utilizando mioцитos aislados de corazón y el

indicador fluorescente fluo-3 se ha podido demostrar (CHENG y col., 1993) la presencia

de pequeñas regiones fluorescentes (calcium sparks).

Esas regiones tienen ~1,5  $\mu m$  de radio y corresponden a elevaciones momentáneas de la concentración de  $Ca^{2+}$ . Aparecen en puntos concretos del citoplasma cuando la célula está en

reposo. A su localización varía con el tiempo (Fig. 1). Se estima que puede haber unos 100

destellos/s en un mioцитo en reposo.

Cada destello hace que la concentración de  $Ca^{2+}$  en un punto del citoplasma se eleve desde

~100 nanomolar (nivel basal) hasta ~170 nanomolar siendo ~20 ms el tiempo de desaparición

de un destello. Cada destello origina al abrirse un canal o un pequeño grupo de canales de la membrana plasmática o del retículo endoplásmico/sarcoplásmico.

Estas elevaciones momentáneas de  $Ca^{2+}$  se

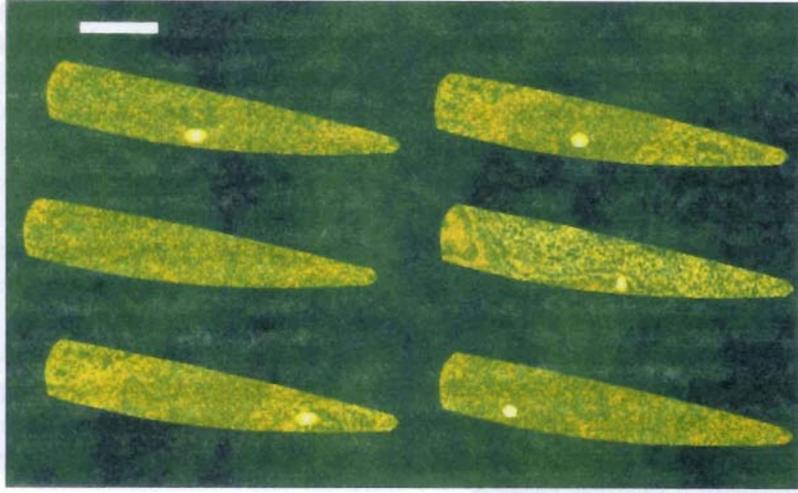


FIGURA 1. Destellos de  $Ca^{2+}$  en un mioцитo de corazón de rata en estado de reposo. Las seis imágenes de microscopía confocal están tomadas cada 0,5 s. El indicador fluorescente es fluo-3. Barra de referencia =

14  $\mu m$  (tomado de CHENG y col., 1993).

La concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma celular son los siguientes:

importantes que controlan el nivel de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma son los siguientes: FOLJ, 1987). Los sistemas de transporte más importantes son los de salida de este ión (CARA-FLUX) y de entrada (SALE). El balance entre los flujos de entrada y salida de este ión controla la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma.

La concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma es en cada momento el balance entre los flujos de entrada y salida de este ión (CARA-FLUX, 1987). Los sistemas de transporte más importantes que controlan el nivel de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma celular son los siguientes:

de ondas en distintos tipos de células (LECH-LEITER y col., 1991; CLAPHAM y SNEYD, 1995).

Un detalle que resalta la complejidad de la señal de  $Ca^{2+}$  es la existencia de distintos tipos de ondas en distintos tipos de células (LECH-LEITER y col., 1991; CLAPHAM y SNEYD, 1995).

Un detalle que resalta la complejidad de la señal de  $Ca^{2+}$  es la existencia de distintos tipos de ondas en distintos tipos de células (LECH-LEITER y col., 1991; CLAPHAM y SNEYD, 1995). La concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma es en cada momento el balance entre los flujos de entrada y salida de este ión (CARA-FLUX) y de entrada (SALE). El balance entre los flujos de entrada y salida de este ión controla la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma. Estas elevaciones momentáneas de la concentración de  $Ca^{2+}$ . Aparecen en puntos concretos del citoplasma cuando la célula está en reposo. A su localización varía con el tiempo (Fig. 1). Se estima que puede haber unos 100 destellos/s en un mioцитo en reposo. Cada destello hace que la concentración de  $Ca^{2+}$  en un punto del citoplasma se eleve desde ~100 nanomolar (nivel basal) hasta ~170 nanomolar siendo ~20 ms el tiempo de desaparición de un destello. Cada destello origina al abrirse un canal o un pequeño grupo de canales de la membrana plasmática o del retículo endoplásmico/sarcoplásmico produce al des-polarizar la membrana plasmática de un mioцитo (Fig. 2) as un ejemplo de onda de  $Ca^{2+}$ .

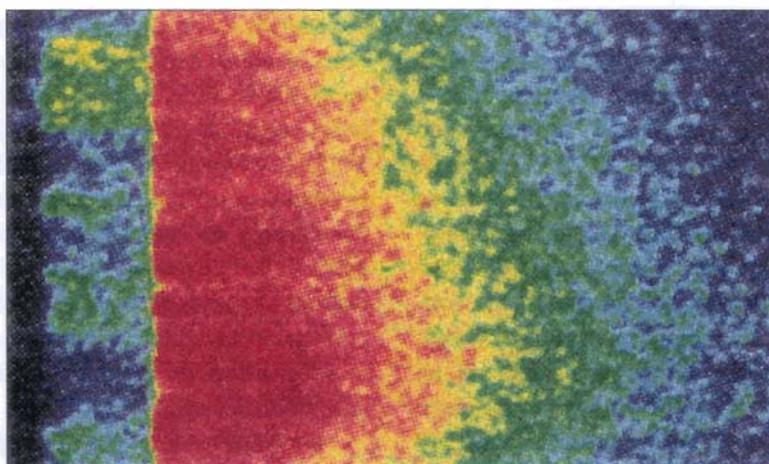


FIGURA 2. Onda de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de un miocito de corazón. La despolarización de la membrana plasmática provoca la salida masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  (onda) desde el interior del retículo sarcoplásmico. La localización del sitio donde se genera la onda varía al azar de un latido a otro. La imagen corresponde a una microscopía confocal tras llenar la célula con el indicador fluorescente fluo-3. El tratamiento con pseudo-color permite mostrar distintas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . El color rojo corresponde a la concentración más alta y el azul a la concentración más baja (tomado de CANNELL y col., 1995).

### Canales de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática

La membrana plasmática dispone de canales que permiten la entrada selectiva de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio externo (CLAPHAM, 1995). Se clasifican según su mecanismo de apertura en:

**Canales sensibles a voltaje.** Abundan de forma muy especial en células excitables (neuronas, células musculares y endocrinas). Se activan tras una despolarización de la membrana plasmática (McCLESKEY, 1994) y son de apertura temporal ya que tienden a cerrarse espontáneamente. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de estos canales puede activar directamente la salida de  $\text{Ca}^N$  desde depósitos intracelulares. Esto ocurre en algunas células excitables como músculo cardíaco y neuronas. La actividad de estos canales puede estar modulada por ciertos agonistas o reguladores intracelulares como el

AMP cíclico.

**Canales sensibles a ligandos.** La apertura de estos canales se produce por la unión de un agonista extracelular que generalmente es un neurotransmisor. Estos canales son especialmente importantes en músculo liso y neuronas.

**Canales activados por agotamiento de las reservas intracelulares (store-operated channels),** también conocidos como: *I<sub>CRAC</sub>* (corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la salida), o *entrada capacitativa de  $\text{Ca}^{2+}$* . Están presentes en gran variedad de células y su activación está controlada por el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en los depósitos intracelulares del retículo endoplásmico o sarcoplásmico, según el tipo de célula (PUTNEY y BIRD, 1993; CLAPHAM, 1995). Este mecanismo permite la entrada de  $\text{Ca}^N$  desde el medio externo al citoplasma y sirve para recargar los depósitos intracelulares.

### Canales intracelulares de $\text{Ca}^{\text{M}}$

La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares se realiza a través de dos tipos de canales que muestran similitudes **estructurales** y **funcionales**. El receptor de rianodina, presente en la membrana de retículo **endoplásmico/sarcoplásmico**, que es especialmente abundante en células excitables y el **receptor** de  $\text{IP}_3$  que se localiza **mayoritariamente** en la membrana de retículo **endoplásmico** y es **típico** de células no excitables (BERRIDGE, 1993).

El receptor de rianodina (canal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) recibe ese nombre por la capacidad para **unir in vitro** al alcaloide **rianodina**. El receptor de rianodina **corresponde** a lo que se conoce como pies de **unión** que son las estructuras que conectan las **cisternas terminales** del retículo **sarcoplásmico** con la membrana de los **túbulos T** (FRANZINI-ARMSTRONG y JORGENSEN, 1994). Técnicas de **microscopía electrónica** (LAI y col., 1988; SAITO y col., 1989; WAGENKNECHT y col., 1989; RADERMACHER y col., 1992) y de **clonación molecular** (TAKESHIMA y col., 1989) muestran que el receptor de rianodina es una **proteína formada** por cuatro **subunidades** iguales (la masa molecular de cada **subunidad** es de  $\sim 550$  kDa). La fuente **más** abundante de este receptor es la membrana de retículo **sarcoplásmico** de músculo esquelético. El receptor de rianodina en mamíferos está codificado por tres **genes** que dan **lugar** a las **isoformas**: *ryr-1* **presente** en músculo **esquelético**; *ryr-2*, la isoforma **más** abundante en músculo **cardíaco** y *ryr-3* que se expresa en cerebro y en **gran** variedad de tejidos incluyendo hígado, **riñón**, páncreas, estómago, intestino, e incluso músculo esquelético y corazón.

La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del receptor/canal de rianodina está controlada en vertebrados por

el potencial de membrana de los **túbulos T** (MEISSNER, 1994; SCHNEIDER, 1994). Estudios farmacológicos han demostrado (RIOS y BRUM, 1987) la existencia de una **proteína** denominada receptor de **dihidropiridina** (receptor de *DHP*) que se **localiza** en los **túbulos T** y que detecta cambios en el potencial de membrana durante el proceso de **excitación-contracción**. Esta proteína es un **canal** de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible a voltaje de tipo L (CAMPBELL y col., 1988; CATTERALL, 1991).

La activación del receptor de rianodina en vertebrados también responde a **efectores endógenos**. La activación por  $\text{Ca}^{2+}$  se conoce como **salida** de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  siendo un mecanismo operativo al menos en músculo **cardíaco** (FABIATO, 1983). Otro ligando **activador** es **ADP-ribosa** cíclica (*cADPR*), **metabolito derivado** del  $\text{NAD}^+$ . La activación por **cADPR** se descubrió en huevos de erizo de mar (CLAPPER y col., 1987; GALIONE y col., 1991), aunque después se ha observado en otros tipos de células incluyendo las de **músculo cardíaco**, páncreas y sistema **nervioso**. **cADPR** se encuentra en **gran número** de tejidos de **mamífero** (RUSINKO y LEE, 1989) y parece ser **agonista** fisiológico de *ryr-2* y *ryr-3*.

El receptor de  $\text{IP}_3$  es una **proteína/canal típico** de la **membrana** de retículo **endoplásmico** que muestra niveles de expresión muy distintos en los diferentes tejidos. La **fuentes más** abundante es la neurona de cerebelo (FURUICHI y col., 1989). **Este canal intracelular** de  $\text{Ca}^{2+}$  está formado por cuatro **subunidades iguales** de masa **molecular** aparente  $\sim 10$  kDa que se **activa** por  $\text{IP}_3$  (MIKOSHIBA, 1993). Cada subunidad puede unir una **molécula** de  $\text{IP}_3$ . Se **conocen** cuatro **genes** que dan lugar a **isoformas** de **gran homología** en **sus** secuencias. Las **homologías** con los **isoformas** del receptor de rianodina **son** mucho menores y no **presentan homología** con

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática. La regulación de este receptor/canal es compleja y además de activarse por  $\text{IP}_3$  se puede activar por quinasa A de proteínas,  $\text{Ca}^{2+}$  6 ATP.

#### Intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

El intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  constituye un mecanismo de expulsión de  $\text{Ca}^{\text{H}}$  que muestra gran capacidad pero baja afinidad para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  (PHILIPSON y NICOLL, 1992). Permite que el  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico disminuya hasta niveles micromolares pero hace necesaria la intervención de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  para que la concentración del catión baje al nivel nanomolar.

El intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  está presente en la membrana plasmática de prácticamente todas las células de mamíferos. El eritrocito es la única fuente conocida donde el intercambiador está ausente (GATTO y col., 1995). Este mecanismo de expulsión de  $\text{Ca}^{2+}$  es especialmente activo en células excitables, sobre todo en neuronas, músculo cardíaco y músculo liso (CARAFOLI, 1987). En músculo esquelético no parece tener un papel relevante. En este último tipo de células, como en muchos otros, el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico en estado de reposo depende de la actividad de las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Bombas de $\text{Ca}^{2+}$

Las células de vertebrados poseen dos tipos de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ , también llamadas *ATPasas dependientes* de  $\text{Ca}^{2+}$ , que pertenecen a lo que se denomina bombas de tipo P (PEDERSEN y CARAFOLI, 1987). Se caracterizan por formar un compuesto covalente enzima-fosfato durante su funcionamiento. Estas bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  poseen similitudes estructurales y funcionales aunque están codi-

ficadas por dos familias distintas de genes y presentan diferente localización subcelular (INESI y KIRTLEY, 1992):

La *ATPasa* dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática (PMCA) se encarga de expulsar  $\text{Ca}^{\text{H}}$  desde el citoplasma al exterior de la célula. Se conocen cuatro genes que codifican las correspondientes formas enzimáticas: *PMCA1*, *PMCA2*, *PMCA3* y *PMCA4*. El gen de *PMCA1* parece expresarse de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos. Algo similar ocurre con el de *PMCA4*, mientras que los genes de *PMCA2* y *PMCA3* se expresan de forma mucho más restringida. Además de la multiplicidad génica existe un polimorfismo proteico debido al procesamiento de los transcritos primarios (mRNA), lo que origina un total de al menos 26 variantes de esta proteína (CARAFOLI, 1992).

La *ATPasa* dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  de Retículo Endoplásmico ó Sarcoplásmico (*SERCA*) se encarga de bombear  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citoplasma al interior del retículo endoplásmico ó sarcoplásmico. Las proteínas *SERCA* están codificadas por tres genes distintos que presentan distinto grado de expresión dependiendo del tejido y del estado de desarrollo del organismo. La diversidad aumenta con el procesamiento de los RNA mensajeros como ocurre con la PMCA. Así, *SERCA1*, que es la enzima más abundante en músculo esquelético de contracción rápida, presenta dos isoformas: *SERCA1a* (en tejido neonatal) y *SERCA1b* (en tejido adulto). *SERCA2* también presenta dos isoformas: *SERCA2a* con localización preferente en músculo cardíaco y esquelético de contracción lenta y *SERCA2b*. Esta última y *SERCA3* son especialmente abundantes en músculo liso y en tejidos no musculares tales como: intestino, estómago, pulmones, cerebro y páncreas (BRANDL y col., 1987; BURK y col., 1989).

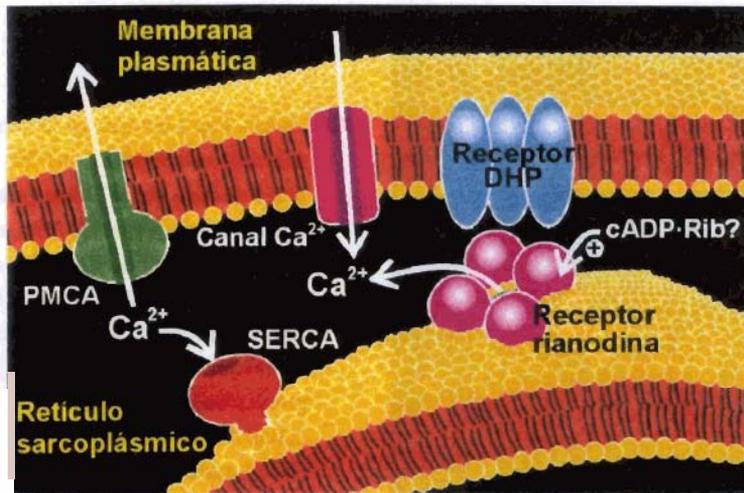


FIGURA 3. Principales sistemas de transporte implicados en el control del  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplásmico de una célula de músculo esquelético. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática y los receptores de rianodina permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al sarcoplasma desde el medio externo o desde el retículo sarcoplásmico, respectivamente. Las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (PMCA y SERCA) sacan  $\text{Ca}^{2+}$  desde el sarcoplasma al medio externo o al retículo sarcoplásmico, respectivamente.

Los dos tipos de ATPasas hacen disminuir el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma de forma distinta. A la PMCA, que es una proteína poco abundante en la membrana plasmática y tiene baja capacidad de trabajo, se le atribuye el papel de mantener el nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$ . A la proteína SERCA que es más abundante en la membrana reticular y tiene mayor capacidad de trabajo se le relaciona con la reuperación del nivel basal cada vez que se produce una señal de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La Fig. 3 muestra los principales sistemas de transporte implicados en el control del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplásmico (sarcoplásmico) de una célula de músculo esquelético.

#### La señal de $\text{Ca}^{2+}$ en el músculo

Uno de los ejemplos más característicos donde el  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce su función como regulador

intracelular es el mecanismo de **contracción del músculo esquelético**. En ausencia de estímulo externo (Fig. 4, panel A), el receptor de dihidropiridina presente en la membrana plasmática (túbulos T) impide la apertura del receptor de rianodina (canal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que se encuentra en la membrana del retículo sarcoplásmico. Por su parte, la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (SERCA) transporta  $\text{Ca}^{2+}$  desde el sarcoplasma al retículo sarcoplásmico utilizando la energía de hidrólisis del ATP. Esta situación provoca un descenso en el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el sarcoplasma (se alcanza el nivel basal de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y hace que troponina C no una  $\text{Ca}^{2+}$ . En estas condiciones, el complejo troponina-tropomiosina impide la interacción de actina con las cabezas S1 de miosina (Fig. 4, panel A). La fibra muscular se encontrará en estado de **relajación**.

La llegada de un impulso nervioso a la unión neuromuscular provoca una onda de des-

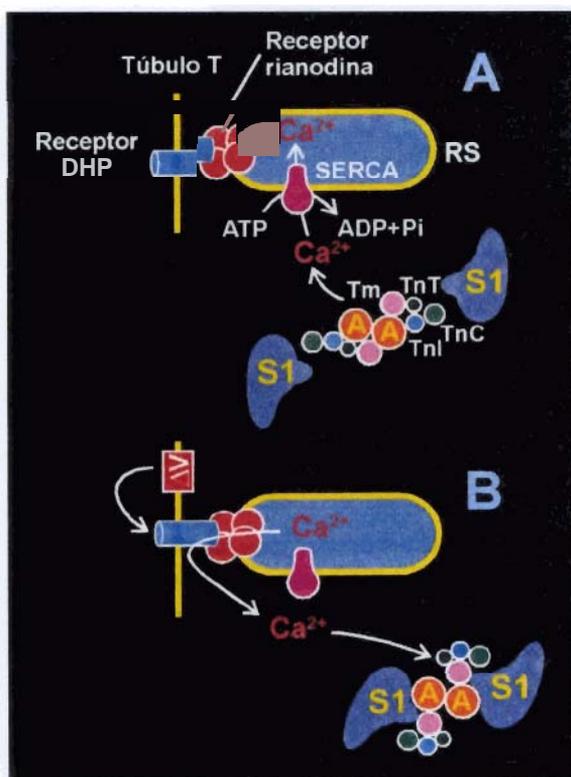


FIGURA 4. Papel del  $Ca^{2+}$  en la contracción del músculo esquelético. (A) El músculo se relaja cuando el  $Ca^{2+}$  libre en el sarcoplasma está en el nivel basal. Esta se debe a que el receptor/canal de rianodina está cerrado y la proteína SERCA bombea  $Ca^{2+}$  al interior del retículo sarcoplásmico (RS). El complejo: troponina (Tn C, Tn I, Tn T)-tropomiosina (Tm) impide la interacción de actina (A) con las cabezas S1 de miosina. (B) El músculo se contrae cuando se eleva el  $Ca^{2+}$  en el sarcoplasma. Un cambio de potencial (AV) en el túbulo T activa al receptor de rianodina a través del receptor de dihidropiridina (DHP). El  $Ca^{2+}$  que sale del retículo sarcoplásmico se une a troponina C (Tn C) lo que modifica la disposición del complejo troponina-tropomiosina. Esto permite la interacción de actina (A) con miosina (S1).

polarización que se transmite por la membrana plasmática (sarcolemma) hasta los túbulos T (Fig. 4, panel B). Esto altera la conformación del receptor de DHP que a su vez activa al receptor de rianodina. La hipótesis más aceptada sobre el acoplamiento excitación-contracción es la teoría del acoplamiento electromecánico (SCHNEIDER, 1994) según la cual el receptor de DHP se encuentra en contacto físico directo (o a través de una proteína que actúa como puente) con el receptor de rianodina ejerciendo una acción inhibitoria sobre la liberación de  $Ca^{2+}$ . La despolarización del túbulo T activa al receptor de rianodina y sale  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico. La elevación del nivel de  $Ca^{2+}$  en el sarcoplasma permite la unión de  $Ca^{2+}$  a troponina C. Esta unión modi-

fica la disposición espacial del complejo troponina-tropomiosina y se produce la interacción actina-miosina (Fig. 4, panel B). La fibra muscular se contrae.

A pesar de que el  $Ca^{2+}$  es la señal bioquímica de la contracción muscular, el mecanismo de la contracción no es único. Así por ejemplo, la célula muscular cardíaca tiene capacidad para generar contracciones rítmicas espontáneas incluso cuando se encuentra aislada *in vitro*. Esta capacidad está relacionada con el potencial de acción cardíaco que se caracteriza por presentar una duración de algunos cientos de milisegundos y una fase de meseta prolongada. La contracción de la célula muscular cardíaca coincide con la fase de meseta del potencial de acción y se produce al abrirse canales de  $Ca^{2+}$

sensibles a voltaje de la membrana plasmática. Esto origina la entrada de una pequeña cantidad de  $Ca^{2+}$  desde el medio externo al sarcoplasma que estimula la salida de más  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplásmico (FABIATO, 1983). La salida del  $Ca^{2+}$  intracelular almacenado, que es el activador de la contracción, se produce a través del receptor de **rianodina**.

A pesar de que todas las células cardíacas se pueden contraer espontáneamente, la actividad **rítmica** del miocardio está controlada por las células del nódulo senoauricular que tienen una mayor **frecuencia** de contracción. La contracción simultánea de las aurículas al tiempo que se relajan los ventrículos y la posterior contracción de los ventrículos cuando se relajan las **aurículas** garantiza el bombeo sanguíneo. La actividad del **corazón** no requiere un impulso nervioso para la contracción, como ocurre en el músculo esquelético, aunque el sistema nervioso autónomo permite aumentar o disminuir la frecuencia del latido cardíaco.

El estímulo de la contracción del músculo liso (fásico o tónico) puede ser un impulso nervioso del sistema autónomo, una hormona o un factor local como **pH**, oxígeno, **CO<sub>2</sub>**, temperatura o la concentración de un determinado ión. La activación de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje y la entrada de  $Ca^{2+}$  desde el espacio extracelular son también características del potencial de acción del músculo liso. Esa entrada de  $Ca^{2+}$  externo a través de los canales puede actuar como señal bioquímica para la contracción. En otros casos, la acción de determinados agonistas sobre receptores de la membrana plasmática dan lugar a la formación de **IP<sub>3</sub>** en el citoplasma (BITAR y col., 1996). Este es un mecanismo indirecto ya que **IP<sub>3</sub>** induce a su vez la salida de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico activando el **receptor/canal** de **IP<sub>3</sub>**.

La elevación de  $Ca^{2+}$ , que se origina por

distintos mecanismos dependiendo del tipo concreto de músculo liso y del estímulo **activador**, permite su unión a calmodulina. La forma **calmodulina- $Ca^{2+}$**  activa un **enzima** del tipo **quinasa** que fosforila la cadena ligera (reguladora) de miosina. Miosina fosforilada interacciona con actina para producir la contracción. La presencia de una fosfatasa específica permite recuperar la forma no fosforilada de miosina. El efecto del  $Ca^{2+}$  sobre el proceso de fosforilación de miosina regula la contracción del músculo liso (WALSH, 1991). El músculo liso carece del complejo de troponina aunque sí tiene tropomiosina. El mecanismo descrito no es único ya que puede haber contracción de músculo liso no dependiente de  $Ca^{2+}$ . Se supone que es una vía complementaria en la que participan algunas proteínas reguladoras como caldesmon y calponina. En este caso intervienen determinadas **quinasas** de proteínas que **fosforilan** a caldesmon y calponina. Las formas no fosforiladas de estas proteínas son **inhibidores** de la contracción.

La actividad funcional del músculo proporciona uno de los ejemplos más claros sobre el papel del  $Ca^{2+}$  como señal bioquímica si bien el mecanismo molecular de la contracción y el efecto concreto del  $Ca^{2+}$  son específicos para cada tipo de músculo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLBRITTON, N.L., MEYER, T. y STRYER, L. 1992: **Range** of messenger action of calcium ion and inositol **1,4,5-trisphosphate**. *Science* 258: 1812-1815.
- BERRIDGE, M.J. 1993: Inositol trisphosphate and calcium **signalling**. *Nature* 361: 315-325.
- BERRIDGE, M.J. 1997: **Elementary** and global

- aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* **499**: 291-306.
- BITAR, K.N., BRADFORD, P.G., PUTNEY, J.W. y MAKHLOUF, G.M. 1986: Stoichiometry of contraction and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization by inositol 1,4,5-trisphosphate in isolated gastric smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **261**: 16591-16596.
- BRANDL, C.J., DeLEON, S., MARTIN, D.R. y MacLENNAN, D.H. 1987: Adult forms of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **262**: 3468-3474.
- BURK, S.E., LYTTON, J., MacLENNAN, D.H. y SHULL, G.E. 1989: cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar  $\text{Ca}^{2+}$ -pump. *J. Biol. Chem.* **264**: 18561-18568.
- CAMPBELL, K.P., LENNG, A.T. y SHARP, A.H. 1988: The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci.* **11**: 425-430.
- CANNELL, M.B., CHENG, H. y LEDERER, W.J. 1995: The control of calcium release in heart muscle. *Science* **268**: 1045-1049.
- CARAFOLI, E. 1987: Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- CARAFOLI, E. 1992: The  $\text{Ca}^{2+}$  pump of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **267**: 2115-2118.
- CATTERALL, W.A. 1991: Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels. *Cell* **64**: 871-874.
- CHENG, H., LEDERER, W.J. y CANNELL, M.B. 1993: Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* **262**: 740-744.
- CLAPHAM, D.E. 1995: Calcium signaling. *Cell* **80**: 259-268.
- CLAPHAM, D.E. y SNEYD, J. 1995: Intracellular calcium waves. En: *Advances in Second Messengers and Phosphoprotein Research*. Ed.: Means, A. R. Raven Press, Nueva York.
- CLAPPER, D.L., WALSETH, T.F., DARGIE, P.J. y LEE, H.C. 1987: Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* **262**: 9561-9568.
- FABIATO, A. 1983: Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* **245**: C1-C4.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. y JORGENSEN, A.O. 1994: Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **56**: 509-534.
- FURUICHI, T., YOSHIKAWA, S., MIYAWAKI, A., WADA, K., MAEDA, N. y MIKOSHIBA, K. 1989: Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein  $\text{P}_{400}$ . *Nature* **342**: 32-38.
- GALIONE, A., LEE, H.C. y BUSA, W.B. 1991:  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* **262**: 9561-9568.
- GATTO, C., HALE, C.C., XU, W. y MILANICK, M.A. 1995: Eosin, a potent inhibitor of the plasma membrane Ca pump, does not inhibit the cardiac Na-Ca exchanger. *Biochemistry* **34**: 965-972.
- GHOSH, A. y GREENBERG, M.E. 1995: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* **268**: 239-247.
- INESI, G. y KIRTLEY, M.R. 1992: Structural features of cation transport ATPases. *J.*

- Bioenerg. Biomembr.* 24: 271-283.
- KRETSMGER, R.H. 1980: Structure and evolution of calcium modulated proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 8: 119-174.
- LAI, F.A., ERICKSON, H.P., ROUSSEAU, E., LIN, O.-Y. y MEISSNER, G. 1988: Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331: 315-319.
- LECHLEITER, J., GIRARD, S., PERALTA, E. y CLAPHAM, D. 1991: Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* 252: 123-126.
- McCLESKEY, E.W. 1994: Calcium channels: cellular roles and molecular mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 304-312.
- McPHALEN, C.A., STRYNADKA, N.C. y JAMES, M.N.G. 1991: Calcium-binding sites in proteins: a structural perspective. *Adv. Prot. Chem.* 42: 77-144.
- MEISSNER, G. 1994: Ryanodine receptor/ $Ca^{2+}$  release channels and their regulation by endogenous effectors. *Ann. Rev. Physiol.* 56: 485-508.
- MIKOSHIBA, K. 1993: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 86-89.
- PEDERSEN, P.L. y CARAFOLI, E. 1987: Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance for cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146-150.
- PHILIPSON, K.D. y NICOLL, D.A. 1992: Sodium-Calcium exchange. *Curr. Opinion Cell Biol.* 4: 678-683.
- POZZAN, T., RIZZUTO, R., VOLPE, P. y MELDOLESI, J. 1994: Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 595-636.
- PUTNEY, J.W., Jr. y BIRD, G.S.J. 1993: Calcium influx and its control by calcium release. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 368-374.
- RADERMACHER, M., WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R., FRANK, J., INUI, M., CHADWICK, C. y FLEISCHER, S. 1992: Cryo-EM of the native structure of the calcium release channel/ryanodine receptor from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 61: 936-940.
- RIOS, E. y BRUM, G. 1987: Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 325: 717-720.
- RUSINKO, N. y LEE, H.C. 1989: Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of  $NAD^{+}$  into a cyclic metabolite with intracellular  $Ca^{2+}$ -mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* 264: 11725-11731.
- SAITO, A., INUI, M., WALLS, J.S. y FLEISCHER, S. 1989: Mass measurement of the feet structures/calcium release channel of sarcoplasmic reticulum by scanning transmission electron microscopy. *Biophys. J.* 55: 206a.
- SCHNEIDER, M.F. 1994: Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers. *Ann. Rev. Physiol.* 56: 463-484.
- TAKESHIMA, H.J., NISHIMURA, S., MATSUMOTO, T., ISHIDA, H., KANGAWA, K., MINAMINO, N., MATSUO, H., UEDA, M., HANAOKA, M., HIROSE, T. y NUMA, S. 1989: Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* 339: 439-445.
- TSIEN, R.W. y TSIEN, R.Y. 1990: Calcium channels, stores, and oscillations. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6: 715-760.
- WAGENKNECHT, T., GRASSUCCI, R., FRANK, J., SAITO, A., INUI, M. y

**FLEISCHER, S. 1989:** Three-dimensional architecture of the **calcium channel/foot structure** of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338: 167-170.

**WALSH, M.P. 1991:** Calcium-dependent **mechanisms** of regulation of smooth muscle **contraction**. *Biochem. Cell Biol.* 69: 771-800.