

área básica



RAFAEL VARGAS
Docente Fisiología

Calcio

Importancia de su regulación intracelular

RESUMEN: El calcio es un mensajero intracelular fundamental para las células ya que participa en la activación o inactivación de vías de señalización que median una amplia variedad de procesos celulares y sistémicos. Esos procesos van desde fecundación y división celular; diferenciación, desarrollo y crecimiento, hasta mecanismos de muerte, tanto celular como sistémicos. En las últimas décadas se ha logrado dilucidar muchos de los mecanismos moleculares que participan en la vía de señalización por calcio, pero queda un amplio camino por recorrer para entender los múltiples fenómenos en los que el calcio es vital.

PALABRAS CLAVE: Calcio intracelular, retículo endoplásmico, IP3, ryanodina, SERCA.

El calcio es un elemento fundamental para la vida ya que actúa como un mensajero intracelular clave que regula múltiples respuestas. Estas respuestas pueden ser observadas en forma inmediata, mediata o tardía. Ejemplos de respuestas inmediatas son la liberación de neurotransmisores en neuronas, la liberación de hormonas en células endocrinas, la contracción muscular en músculo liso, esquelético o cardíaco; todos estos son fenómenos que tienen una duración del orden de nanosegundos, microsegundos, milisegundos o segundos.

En el mediano plazo el calcio participa en la regulación del metabolismo, estos procesos involucran la activación de una o varias enzimas dependientes de los niveles de calcio citoplasmático; también a mediano plazo el calcio participa en la activación de células del sistema inmune y en procesos marcapasos del sistema respiratorio y cardiovascular. A largo plazo se ha observado que el calcio participa en mecanismos de regulación de la expresión génica que incluyen fenómenos como la fecundación, la división celular, el desarrollo y crecimiento celular y la apoptosis (1) (fig. 1).

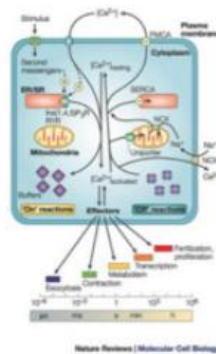


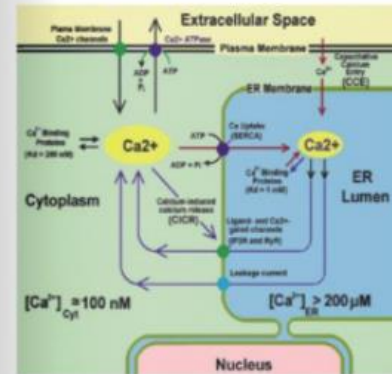
Fig 1. Procesos regulados por el calcio. El calcio modula respuestas celulares a corto plazo, microsegundos o milisegundos; mediano plazo, segundos o minutos y largo plazo, horas e incluso días (Tomado de Berridge et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2003).

área básica

Uno de los campos en donde el calcio ha sido ampliamente estudiado es en el de la neurofisiología pues en las neuronas algunos procesos claves para la transmisión sináptica como el tráfico axonal, la movilización de vesículas, la liberación de neurotransmisores y la modulación de los potenciales de acción, dependen de procesos en los cuales el calcio es fundamental (2,3,4,5,6).

El calcio en su forma ionizada es tóxico para la célula pues tiende a reaccionar con muchos sustratos, por esta razón sus concentraciones son muy bajas en el espacio intracelular, a pesar de esto muchos procesos celulares y sistémicos dependen del calcio por lo cual este es considerado un mensajero intracelular vital. Muchos de los procesos que dependen de la señalización del calcio se activan al aumentar la concentración del calcio citoplasmático en forma temporal y local (la concentración de calcio citoplasmático basal es de 100 nM, fig 2).

El incremento temporal del calcio citoplasmático, y por lo tanto la señalización, se logra a expensas de dos fuentes de calcio: el calcio extracelular y el calcio de reserva intracelular que se almacena en depósitos intracelulares localizados en organelos intracelulares como el retículo endoplásmico, la mitocondria, el aparato de Golgi y la envoltura nuclear entre otros (7).



Calcio extracelular

La concentración del calcio en el espacio extracelular es miles de veces más alta que la del espacio intracelular, su concentración es del orden de 2 mM. El ingreso de calcio extracelular se realiza a través de canales iónicos permeables al ión calcio, que están incrustados en la membrana plasmática. Estos canales de calcio pueden ser dependientes de voltaje (se denominan canales tipo L, N, P/Q, y R) o dependientes de ligando (AMPA, NMDA, kainato, 5HT3 y nicotínicos tipo $\alpha 7$).

Con la apertura de estos canales el calcio extracelular difunde al interior de la célula debido al gradiente de concentraciones entre el medio externo y el interno. Este aumento de calcio citoplasmático se presenta en zonas específicas cercanas a la membrana celular, pero además es fugaz, pues está elevación tiende a reducirse rápidamente.

El aumento generado por la entrada de calcio a través de estos canales es neutralizada por la expulsión del calcio citosólico a través de dos tipos de proteínas de membrana: las bombas de calcio dependientes de ATP y los intercambiadores iónicos, entre los cuales está el intercambiador Na^+/Ca^{++} . En la reducción del calcio citosólico también participan proteínas de unión a calcio presentes en el citoplasma, algunas de las cuales son funcionales y participan en vías de señalización (Kd = 200 nM; calbindina, calmodulina. Fig. 2).

Calcio intracelular

Los depósitos intracelulares pueden liberar calcio al citoplasma a través de dos tipos de canales: los receptores de ryanodina (RyR) y los receptores de inositol trifosfato (IP3R).

Fig. 2. Mecanismos de señalización del calcio. Los niveles de calcio citoplasmático aumentan por entrada de calcio del medio extracelular o por liberación desde los depósitos intracelulares, este flujo se produce por la apertura de diversos tipos de canales. El incremento del calcio citoplasmático es limitado en tiempo y espacio por la presencia de sistemas buffer citoplasmáticos y por la activación de mecanismos de eliminación y/o recaptura (Tomado de Glazner y Ferryhough. Cell calcium. 2002).

área médica

ISSN 2027-8128

U.D.C.A

área básica

Estos receptores pueden ser activados bien por su ligando endógeno específico y/o por un aumento en la concentración de calcio citoplasmático. La activación de estos receptores favorece la salida de calcio almacenado gracias a un gradiente de concentraciones, lo que produce una corriente de calcio hacia el citoplasma inducida por calcio y denominada CICR: calcium-induced calcium release, que contribuye a activar las vías de señalización intracelulares dependientes del calcio^{8,9} (fig.w 2).

El RyR es un homotetrámero constituido por monómeros de 500 kDa. Tiene sitios de unión a calcio y a moduladores como ATP y calmodulina. Posee una alta conductancia para iones monovalentes (600-750 pS) y divalentes (100-150 pS); el tiempo medio de apertura es de 20 ms. La probabilidad de apertura del canal depende del calcio citoplasmático, es alta con calcio 0.1-1 μ M y se reduce con altos niveles (>10 μ M). Se han identificado tres isoformas RyR1 a 3, la forma más abundante en sistema nervioso es el subtipo RyR210. Para caracterizar este receptor se han empleado fármacos que afectan su actividad como la cafeína y el dantroleno.

La cafeína fue el primer fármaco que permitió identificar la liberación de calcio de los depósitos intracelulares. El efecto de la cafeína sobre los receptores de ryanodina depende de su concentración. Estudios en canales RYR aislados han demostrado que la cafeína a concentraciones menores a 2mM incrementa la probabilidad de apertura del canal en presencia de calcio citoplasmático del orden de micromolar. A concentraciones mayores de 5 mM abre el canal, aún frente a calcio citoplasmático bajo (picomoles) e incrementa el tiempo en el que permanece abierto el canal. La cafeína penetra rápidamente las membranas y la concentración intracelular se equilibra con la externa en 100 -150 ms (11,12,13).

El dantroleno es un fármaco empleado originalmente como relajante muscular y posteriormente para el tratamiento de la hipertermia maligna. El mecanismo de acción es reducir la probabilidad de apertura de los canales RYR. Las concentraciones efectivas reportadas varían entre 10 y 90 μ M1 (4,15).

El receptor para IP3 (IP3R) es también un homotetrámero, cada subunidad tiene cerca de 2700 aminoácidos y seis dominios transmembrana. Se han identificado cuatro isoformas IP3R1 a 4, los que se diferencian en su afinidad por IP3 (Kd<10 nM). La conductancia al calcio es de 50 pS y el tiempo de apertura de 4 ms.

Al igual que RyR tienen una modulación bifásica por el calcio. La probabilidad de apertura del canal depende del calcio citoplasmático, es óptima con concentraciones de calcio de 300 nM, pero se inhibe con concentraciones de calcio más bajas o más altas. La presencia de IP3 aumenta la afinidad del calcio a los sitios de unión del canal¹⁶. Para su caracterización también se han empleado fármacos que interfieren con su actividad como las xestospinginas, la heparina o los análogos del IP3.

Las Xestospinginas son un grupo de sustancias, aislada en 1997 de esponjas marinas, cuya acción es bloquear la liberación de calcio inducida por IP3. Se aislaron varios subtipos de Xestospinginas denominados A, C y D; de estas la Xestospingina C presentó un mayor bloqueo de la liberación de calcio. Esto se observó en vesículas aisladas de retículo endoplásmico de cerebelo (17,18,19).

El efecto final es reducir la probabilidad de apertura de los canales IP3R. Las concentraciones de Xestospingina C que son efectivas para bloquear estos receptores en cultivos celulares varían entre 5 y 20 μ M. Si bien es cierto que inicialmente se describió a la Xestospingina C como un bloqueador selectivo de IP3R, trabajos recientes indican que también puede bloquear a la SERCA en forma similar a taspigargina, induciendo el agotamiento del calcio intracelular (18,19).

Otra sustancia empleada para caracterizar los receptores IP3 es la heparina. La heparina es una molécula hidrosoluble, compuesta por una cadena de polisacáridos de alto peso molecular (4 a 40 KDa), que no atraviesa membranas lipídicas. Se ha empleado como bloqueador de IP3R en modelos que incluyen bicapas lipídicas y miocitos permeabilizados. Actúa sobre estos receptores con concentraciones del orden de μ g/ml; es menos útil a mayores concentraciones (mg/ml) ya que altas concentraciones de heparina secuestran el calcio libre (20,21,22). La heparina se une con mayor afinidad a los receptores IP3R3 que al IP3R1 o al IP3R2 (23).

Los niveles de calcio en los depósitos intracelulares se mantienen debido por un lado a la captura del ión calcio realizada por la bomba de calcio de ATP del retículo endoplásmico (SERCA) y, por otro lado, a la participación de proteínas fijadoras de calcio tales como calsequestrina y calreticulina presentes en la luz de estos depósitos. La SERCA es una proteína que forma parte de la familia de ATPasas unidas a membranas capaces de transportar calcio empleando la energía química producida por la hi-

área básica

drólisis de ATP. El lado citoplasmático de la proteína tiene una alta afinidad por calcio ($K_a=10^{-6}$ a pH=7), mientras que del lado luminal la afinidad es baja ($K_a=10^{-3}$ a pH=7).

Existen 3 isoformas de SERCA: subtipo 1, subtipo 2 (subtipos a y b) y subtipo 3, de las cuales SERCA 3 se expresa en sistema nervioso central²⁴. Uno de los fármacos empleados en el estudio de la SERCA es la taspigargina, cuyo efecto es bloquear la captura de calcio y provocar el vaciamiento de los depósitos de calcio intracelular. La taspigargina bloquea SERCA a concentraciones de 20 nM y causa una liberación lenta de calcio del RE. También inhibe canales de calcio tipo N y L a altas concentraciones: 0.2 - 2 μ M (23,24,25).

La liberación de calcio de los depósitos de calcio a través de canales IP3R, paradójicamente, activa un mecanismo de entrada de calcio a través de la membrana plasmática llamado entrada capacitiva (26,27). Una manifestación electrofisiológica de la entrada capacitiva de calcio es la denominada corriente de calcio activada por liberación de calcio (CRAC: Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current). Existen evidencias que muestran como a la salida de calcio de los reservorios intracelulares, vía receptores IP3, se acopla una entrada de calcio al citoplasma, probablemente a través de los denominados receptores operados por depósitos (SOCs: Store operated calcium channels), presentes en la membrana plasmática. Un candidato a receptor tipo SOC es el receptor TRP3 (28).

La activación o inactivación de todos estos elementos hacen que la concentración de calcio citoplasmático aumente o disminuya siguiendo un patrón característico que se describe en función del espacio como microdominios de calcio y en función del tiempo como picos y ondas de calcio, con estas fluctuaciones de calcio citoplasmático se activan fenómenos fundamentales para la vida de los organismos (29,30).

BIBLIOGRAFIA

1. Berridge, M. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361:315-325.
2. Kennedy, M. 1989. Regulation of neuronal function by calcium. *TINS*. 12: 417 - 419.
3. Berridge, M. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiology*. 499: 291-306.
4. Berridge, M. Neuronal calcium signalling. 1998. *Neuron*. 21: 13-26.
5. Thomas A, Bird G, Hojnoczky G, Robb-Gaspers L, Put-

ney J. 1996. Spatial. and temporal aspects of cellular calcium signalling. *FASEB J*. 10: 1505-1517.

6. Spafford JD, Zamponi GW. 2003. Functional interactions between presynaptic calcium channels and the neurotransmitter release machinery. *Current Opinion in Neurobiology*. 13:308-314.

7. Berridge, M., Bootman, M. and Lipp, P. 1998. Calcium a life and death signal. *Nature*. 395: 645-648.

8. Lee HB, Xu L, Meissner G. 1994. Reconstitution of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel protein complex into proteoliposomes. *J Biol Chem* 269:13305-13312.

9. Patterson RL, Boehning D, Snyder SH. 2004. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem*. 73:437-465.

10. Rossi D, Sorrentino V. 2002. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca²⁺-release channels. *Cell Calcium*. 32(5-6):307-319.

11. Rousseau E, Smith JS, Meissner G. 1987. Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca²⁺ release channel. *Am J Physiol*. 253:C364-C368.

12. McPherson PS, Kim YK, Valdivia H, Knudson CM, Takekura H, Franzini-Armstrong C, Coronado R, Campbell KP. 1991. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7:17-25.

13. Verkhatsky A. 2005. Physiology and pathophysiology of the calcium store in the endoplasmic reticulum of neurons. *Physiological reviews*. 85:201-279.

14. Ellis K, Carpenter J. 1974. Mechanism of control of skeletal-muscle contraction by dantrolene sodium. *Arch Phys Med Rehabil* 55:362-369.

15. Ohta T, Ito S, Ohga A. 1990. Inhibitory action of dantrolene on Ca-induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum in guinea pig skeletal muscle. *Eur J Pharmacol*. 178:11-19.

16. Taylor CW, Laude AJ. 2002. IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium*. 32(5-6):321-34.

17. Gafni J, Munsch JA, Lam TH, Catlin MC, Costa LG, Molinski T, Pessah I. 1997. Xestospingins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19(3): 723-733.

área médica

ISSN 2027-8128

U.D.C.A

área básica

18. De Smet P, Parys JB, Vanlingen S, Bultynck G, Callewaert G, Gallone A, De Smedt H, Missiaen L. 1999. The relative order of IP₃ sensitivity of types 1 and 3 IP₃ receptors is pH dependent. *Pflugers Arch* 438:154-158.
19. Castonguay A, Robitaille R. 2002. Xestospongine C is a potent inhibitor of SERCA at a vertebrate synapse. *Cell Calcium* 32:39-47.
20. Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo A, Somlyo A. 1989. Cytosolic Heparin Inhibits Muscarinic and α -Adrenergic Ca²⁺ Release in Smooth Muscle. Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J Biol Chem*. 264:17997-18004.
21. Bultynck G, Sienaert J, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H, Boens N, Dehaen W, Missiaen L. 2003. Pharmacology of inositol trisphosphate receptors. *Eur J Physiol* 445:629-642.
22. Laporte R, Hui A, Laher I. 2004. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 56:439-513.
23. Nerou EP, Riley AM, Potter BV, Taylor CW. 2001. Selective recognition of inositol phosphates by subtypes of the inositol trisphosphate receptor. *Biochem J*. 355:59-69.
24. De Meis L, Arruda AP, Carvalho DP. 2005. Role of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in thermogenesis. *Biosci Rep*. 25(3-4):181-190.
25. Shmigol A, Kostyuk P, Verkhatsky A. 1995. Dual action of thapsigargin on calcium in sensory neurons: inhibition of Ca²⁺ uptake by caffeine-sensitive pools and blockade of plasmalemmal Ca²⁺ channels. *Neuroscience* 65:1109-1118.
26. Putney J, McKay R. 1999. Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*. 21(1):38-46.
27. Parekh AB. 2003. Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol*. 547(2):333-348.
28. Van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL. 2000. Ca²⁺ entry mediated by store depletion, S-nitrosylation, and TRP3 channels. Comparison of coupling and function. *J Biol Chem*. 275(37):28562-28568.
29. Berridge M, Bootman M, Roderick H. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 517-529.
30. Glazner GW, Ferryhough P. 2002. Neuronal survival in the balance: are endoplasmic reticulum membrane proteins the fulcrum?. *Cell Calcium*. 32(5-6):421-33.