SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Fisiología

• Boletín Informativo de la SECF · Volumen 8 - nº 1 Septiembre 2005

TITULARES

- **PREMIO JUAN NEGRÍN 2005**
- **LA MICROSCOPIA CONFOCAL EN EL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES α, β Y δ EN EL ISLOTE DE LANGERHANS INTACTO.** Ivan Quesada.
- **20 AÑOS DE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}.** Carlos Villalobos.
- **ALDOSTERONA: ¿ALGO MÁS QUE UN MINERALOCORTICOIDE?.** Diego Alvarez de la Rosa.
- **EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR.** Inmaculada Navarro-Lérida, Mónica Martínez-Moreno y José Ignacio Rodríguez-Crespo.
- **LA FISIOLOGÍA EN EL ESPACIO EUROPEO DE EDUCACIÓN SUPERIOR.** Ginés M. Salido

INFORME DE LA JUNTA DIRECTIVA

En el último congreso de la SECF, celebrado en Sevilla el pasado mes de febrero, se constituyó la nueva Junta Directiva de nuestra Sociedad, quedando integrada por:

Presidente: Rafael Alonso (Universidad de la Laguna).
Presidente electo: Constancio González (Universidad de Valladolid).
Presidente saliente: Salvador González-Barón (Universidad de Málaga).
Secretario: Andrés Morales (Universidad de Alicante).
Tesorero: Javier Salazar (Universidad de Murcia).
Vocal: Rafael Fernández-Chacón (Universidad de Sevilla).
Vocal: Javier Cudeiro (Universidad de A Coruña).

La primera reunión de la misma tuvo lugar durante el propio Congreso, en donde se plantearon las principales líneas de actuación, que pueden resumirse en las siguientes:

- a)Fomentar la captación de nuevos Socios, en particular de jóvenes investigadores, lo cual sólo podrá llevarse a cabo a través de la colaboración activa de los miembros actuales.
- b)Mantener y potenciar el Boletín de la SECF como vehículo de comunicación entre los miembros de esta Sociedad. Para este nuevo impulso se renueva el cargo de editor, pasando a ser Angel Nadal y se nombran como nuevos miembros del Comité editorial a Carlos Villalobos, Mónica de la Fuente, Cristina Ripoll, Esther Fuentes y José Sánchez-Criado.
- c)Incrementar la captación de recursos económicos, buscando financiación externa, fundamentalmente de empresas que acepten vincularse como "Socios Protectores" a cambio de la cesión de espacios publicitarios en el Boletín. En la actualidad, la edición del boletín constituye uno de los principales conceptos de gasto de la SECF.
- d)Revitalizar la página web de la SECF, labor en la que se centrará Rafael Fernández-Chacón. Se pretende ir "colgando" en ella toda la información de interés en relación con ofertas de becas, anuncios de congresos relevantes, información docente, etc.
- e)Actualizar la relación de grupos de investigación de Fisiología nacionales y patrocinar cursos o jornadas específicas de interés general.
- f)Abordar la problemática de la adaptación de la enseñanza de la Fisiología al nuevo EEES, designándose una comisión de trabajo específica. La comisión estaría formada, a su vez, por dos subdivisiones, una encargada de las adaptaciones en las titulaciones de Ciencias Experimentales (Biología, Farmacia y Veterinaria, coordinada por Andrés Morales, Ana Ilundain y Ginés Salido), y otra en las de Ciencias de la Salud (coordinada por Antonio Canedo y Jordi Palés). Se pretende que las conclusiones sean presentadas en el próximo Congreso de la SECF, a celebrar en Valladolid en 2007, en el marco de un symposium específico con ponentes de otras Universidades Europeas.
- g)Fomentar la participación de grupos españoles en Congresos internacionales de relevancia, especialmente a través de la organización de simposia. En este sentido ya se han tomado las iniciativas inmediatas, como la participación en el próximo Congreso Ibero-Latinoamericano que está organizando la Sociedad Argentina de Fisiología, y el apoyo financiero para la propuesta de simposio en el próximo Congreso de la FEPS a celebrar en Munich, sobre el cual se ha enviado información desde la Secretaría.

A pesar de sus dificultades se trata de un programa de trabajo realista, que está dirigido a dar soluciones a muchas de las inquietudes que se plantean los fisiólogos españoles a nivel individual. En cualquier caso, animamos a todos los Socios a mantener una comunicación activa con los miembros de la Junta Directiva, con objeto de que el funcionamiento de la SECF responda adecuadamente al sentir de todos sus componentes.

· Editor ·

Ángel Nadal Navajas, Departamento de Fisiología e Instituto de Bioingeniería Universidad Miguel Hernández de Elche, Sant Joan d'Alacant, Alicante 03550.
Teléfono: 965919535, Fax: 965919547, e-mail: nadal@umh.es

· Comité editorial ·

Fernando de Castro (Salamanca, fdecastro@usal.es), Mónica de la Fuente (Madrid, mondelaf@bio.ucm.es), Esther Fuentes (Sant Joan d'Alacant, efuentes@umh.es), Cristina Ripoll (Sant Joan d'Alacant, ripollcr@umh.es), José E. Sánchez-Criado (Córdoba, fi1sarcj@uco.es), Javier Salazar (Murcia, salazar@um.es), Carlos Villalobos (Valladolid, carlosv@ibgm.uva.es).

Diseño, Maquetación e Impresión: Limencop CEE · 966 658 487 ·

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

- **Presidente:** Rafael Alonso (ralonso@ull.es).
- **Presidente electo/Delegado FEPS:** Constancio Gonzalez (constanc@ibgm.uva.es).
- **Presidente Saliente:** Salvador González-Barón (sgonzalez@uma.es.
- **Secretario:** Andrés Morales (andres.morales@ua.es)
- **Tesorero:** Javier Salazar (salazar@um.es).
- **Vocal:** Rafael Fernández Chacón (rfchacon@us.es). / Javier Cudeiro (jcud@udc.es)

Direcciones de contacto en **www.seccff.org** · D.L.:SE-321-2000

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

A. Remisión de originales

La remisión de originales se hará exclusivamente por correo electrónico a la dirección del editor o de cualquiera de los miembros del comité editorial. Se puede utilizar cualquier procesador de texto, programa y formato gráfico, aunque es preferible remitir el manuscrito en formatos usuales. En todo caso deben indicarse en la carta de remisión los formatos empleados para texto, tablas, gráficos y fotografías. La utilización de formatos poco usuales retrasará la publicación. En caso de emplear algún sistema de compresión para fotografías o gráficos, debe comprobarse que la descompresión no deteriora la calidad de las imágenes. La carta de remisión debe incluirse en el cuerpo del mensaje electrónico y el original y las figuras en forma de archivos anexos. El texto del artículo debe adjuntarse como un único archivo, incluyendo la página con el título, el texto principal, bibliografía, etc. Cada tabla o figura debe remitirse en un anexo independiente, nombrando cada anexo con el nombre del primer autor y el número de tabla o figura que contenga (ejemplo: Cunqueiro-Fig.1).

B. Composición de los originales

- **1.** Primera página

  Título
  Autores
  Filiación de los autores
  Autor y dirección para correspondencia si procede (incluir números de teléfono y fax, y una dirección de correo electrónico)

- **2.** Segunda página

  Sumario, si procede, en una extensión no superior a 200 palabras, en el mismo idioma que el resto del artículo.

- **3.** Cuerpo del texto

  Los artículos no deberán sobrepasar las 2.500 palabras e irán en folios numerados. Deberán estar escritos en un estilo claro y con pretensión divulgativa, de forma que puedan ser entendidos por cualquier fisiólogo, independientemente de su área de especialización. El procedimiento más simple es tomar como ejemplo cualquier artículo publicado previamente en Fisiología. En caso de no disponer de ningún ejemplar, puede solicitarse a cualquiera de los miembros del comité editorial o a la Secretaría (andres.morales@ua.es) para ser incluido en la lista de distribución. Alternativamente, pueden consultarse los artículos de los números anteriores en http://www.seccff.org.

  Los artículos podrán contener resultados ya publicados, siendo entonces responsabilidad exclusiva de los autores obtener los permisos correspondientes de las revistas o libros donde hayan sido publicados originalmente. Debido a la pretensión divulgativa, cada autor podrá organizar el texto en la forma que crea más oportuna, si bien se sugiere una división en secciones que facilite su lectura.

- **4.** Otros

  a.Notas (si las hubiere) y agradecimientos.
  b.Bibliografía. Las referencias, muy seleccionadas, se insertarán en el cuerpo del texto entre paréntesis (ejemplo: Chacón y Mairena, 1999). La relación completa de referencias bibliográficas deberá incluirse al final del texto, por orden alfabético y cronológico, de acuerdo a los formatos más habituales. Ejemplo: Gómez J, Belmonte J (1910) Deciphering bullfighting. J Taurom 57: 200-235.
  c.Pies de figuras. Deberán incluirse a continuación de la bibliografía y en páginas aparte.
  d.Figuras. Su número no deberá ser superior a 2-3 por artículo, y el tamaño máximo aceptado será el de una hoja impresa (DIN-A4). No se publicaran imágenes en color. En el caso de figuras previamente publicadas, si fuere necesario, deberá acompañarse autorización para su reproducción en Fisiología.

ENTREGA DEL PREMIO JUAN NEGRÍN AL PROFESOR FRANCISCO BEZANILLA

Por Carmen Negrín (Sevilla, España, 10 de febrero de 2005)

En el pasado congreso de la SECF en Sevilla (febrero, 2005), nuestra Sociedad concedió el premio Juan Negrín a Francisco Bezanilla, Hagiwara Professor of Neuroscience, del Departamento de Fisiología de la Universidad de California en Los Angeles, USA y miembro del Valdivia, Chile.
En esta sección transcribimos las palabras de agradecimiento que la Sra. Carmen Negrín pronunció durante el acto de entrega del premio Juan Negrín al Dr Bezanilla.

Señor(a) Presidente,
Señor Profesor Bezanilla,
Señoras y Señores,

Hace dos años estábamos en el Puerto de la Cruz, en Tenerife, entregando, por primera vez, el Premio Juan Negrín a un joven y simpático profesor alemán, ya Premio Nobel, el Señor Erwin Neher.

Recuerdo haber dicho en esa ocasión, que esperaba que, algún día, el premio que Ud., Profesor Bezanilla, va a recibir hoy, llegase a ser tan reconocido como lo es el Premio Nobel. No sé si será así, pero el hecho de que hoy estemos reunidos en esta magnífica ciudad, es significativo de la importancia que se le quiere otorgar.

Como nieta de Juan Negrín, tal vez sea la persona menos indicada para evocarlo objetivamente, pues el recuerdo que tengo de él, es que era perfecto. Respetuoso, generoso y atento, más que inteligente, brillante, alegre, exigente con los demás pero sobre todo con él mismo, de una ética imperturbable, valiente, discreto y con un gran sentido del humor.

Con el tiempo, supe que había inventado lo que se llamó un estalagmógrafo, que había dirigido investigaciones antropológicas en Las Canarias, su país, siempre tan cerca de su corazón a pesar de ser, antes de hora, un Europeísta. También supe que había sido discípulo de Ramón y Cajal y que, a su vez, tuvo a Severo Ochoa como discípulo. Como decía mi tío, el neurólogo Juan Negrín Jr., que algunos de Uds. habrán conocido, fue "Maestro de maestros", algunos de los cuales llegaron a fundar Cardiología en México y a dirigir el Colegio de España que después se llamó el Colegio de México. Muchos de ellos tuvieron que tomar el camino del exilio, pero otros pocos, como Grande Covián y del Corral pudieron transmitir su legado científico en España. Un legado que, yo diría, nació de dos conceptos: "aprender a aprender", lema que la UNESCO adoptó más de 50 años después, y "siempre más lejos". Este legado dejó, entre otras huellas, la construcción de la Ciudad Universitaria y el Laboratorio de Fisiología General en Madrid.

Era lógico que, tras el golpe de Estado de 1936, dentro de un gobierno cuya línea de fuerza había sido "Muera la inteligencia", Juan Negrín se volviera la figura científica más injusta y sistemáticamente desfigurada y casi borrada de la memoria colectiva de España.

Sin embargo, los tiempos han cambiado y ha vuelto a brotar esa huella científica indeleble que hace que hoy estemos aquí, recordándolo y celebrándolo.

Después de 40 años de dictadura y de 25 años de democracia, por fin, España está tratando de reconciliarse con su pasado, de verse con ojos nuevos, los ojos de la verdad y con ello, de rehabilitar a aquellos que tanto se lo merecen, tal vez compensando el "déficit ético de España".
Es preciso recordar, en estos días de conmemoración de la liberación de los campos de concentración y en estos momentos complejos de nuestra propia historia contemporánea, que hay que retener las lecciones del pasado y ser vigilantes. El deber de memoria nos lleva también hacia aquellos Republicanos que, por sus ideas, murieron en los campos, o en el destierro, y también hacia los 600 catedráticos destituidos, entre ellos muchos científicos, dejando el país despojado de sus investigadores, paralizando casi totalmente el fructuoso proceso iniciado en esa llamada Edad de Plata.

Antes de terminar, quisiera agradecer a la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas su colaboración con la Fundación Juan Negrín y el haber instituido el Premio Juan Negrín.

Quisiera, por último, felicitar al galardonado, el Profesor Francisco Bezanilla, que se ha distinguido por sus aportaciones excepcionales a la Fisiología, en particular por sus avances relacionados con el funcionamiento de los canales iónicos, y, a título personal, comunicarle mi alegría ya que yo misma soy egresada de la Universidad de California y mi esposo es chileno, como Ud.

Muchas felicitaciones, Gracias.

LA IMPORTANCIA DEL MÉTODO

La microscopia confocal ha permitido un avance importante a la hora de monitorizar parámetros celulares en tejidos y especimenes de cierto espesor. Con técnicas convencionales, este tipo de estudios está limitado por la contribución de la fluorescencia fuera de foco que impide resolver las señales de las células a nivel individual. La microscopia confocal permite eliminar la fluorescencia fuera de foco y seleccionar el espesor de la sección óptica de la que se quiere obtener información. En el presente artículo, se revisa la importancia de la microscopia confocal en el estudio de las diferentes poblaciones endocrinas que constituyen el islote de Langerhans.

LA MICROSCOPIA CONFOCAL EN EL ESTUDIO DE LAS POBLACIONES, Y EN EL ISLOTE DE LANGERHANS INTACTO. Ivan Quesada

El islote de Langerhans: estructura y función.

Las poblaciones de células endocrinas del páncreas apenas constituyen un 1% de la masa total del órgano y se agrupan en estructuras altamente organizadas como son los islotes de Langerhans. El islote tiene un tamaño que oscila entre 100-

400 μm y está compuesto por unas 1000 a 3000 células, distribuidas mayoritariamente en tres poblaciones. El tipo celular dominante (65-80 %) corresponde a la célula β-pancreática, responsable de la liberación de insulina, mientras que la célula α secretora de glucagón y la δ secretora de somatostatina están representadas en una menor proporción (10-15 % y 3-10 %, respectivamente) (Bonner-Weir, 1991). Otros tipos celulares minoritarios como las células PP productoras del polipéptido pancreático constituyen menos del 1%. La función principal del islote de Langerhans es el control de la concentración de la glucosa en sangre en base a la secreción hormonal regulada de las poblaciones endocrinas α, β y δ. Mientras que la célula β libera la hormona insulina con concentraciones crecientes de glucosa, la secreción de glucagón por parte de la célula α tiene lugar en condiciones hipoglucémicas. La liberación de estas dos hormonas glucémicas está además sujeta a una regulación paracrina por parte de la somatostatina de la población δ. Aunque la función del islote está también sometida a un control neuronal y hormonal, la regulación de la glucemia depende, en gran medida, de un correcto funcionamiento de estas tres poblaciones celulares, y de la interacción entre ellas. Alteraciones en el funcionamiento del islote están asociadas al desarrollo de la diabetes mellitus y/o sus complicaciones (Prentki y Matchinsky, 1987).

El islote como modelo de estudio.

Hoy en día se tiene un amplio conocimiento acerca de las vías de señalización que llevan a la célula β a responder ante cambios en la glucemia con la secreción de insulina. Sin embargo, se sabe muy poco de la fisiología de las poblaciones no-β, pese a su importancia en el islote y a su papel en el control de la glucemia (Unger, 1985). Esta carencia de información se debe a varios factores: principalmente, a la escasa representación de estos tipos celulares en el islote frente a la presencia dominante de la célula β, a la falta de patrones de identificación y sobre todo, a ciertas limitaciones técnicas de las metodologías convencionales. Algunos grupos de investigación han aportado información relevante sobre la fisiología de las células α y δ basándose en líneas celulares o en células aisladas en cultivo. Sin embargo, se ha constatado que estos modelos de estudio presentan diferencias significativas con respecto a las observaciones realizadas en el islote de Langerhans intacto (Gilon y cols., 1994). De hecho, este modelo se acerca mucho más al comportamiento fisiológico tal y como han evidenciado estudios "in vivo" (Sanchez-Andres y cols., 1995; Fernandez y Valdeolmillos, 2000). Estas diferencias resultan principalmente de la importancia crítica del contacto célula-célula en el funcionamiento del islote y de la regulación autocrina y paracrina. En base a estos motivos, en los últimos años, varios grupos de investigación han tratado de caracterizar la fisiología de las células, α, β y δ en el islote intacto, o incluso revisar conceptos cuyas conclusiones previas derivaban de estudios procedentes de modelos diferentes. El grupo de Patrick Rorsman destaca por la utilización de técnicas electrofisiológicas en islote intacto permitiendo una caracterización individualizada de las propiedades eléctricas de cada tipo celular (Gopel y cols., 2000, 2004). Sin embargo, estas técnicas presentan dificultades y limitaciones en su aplicación: su uso no permite observar el comportamiento simultáneo de distintas células. Por el contrario, las técnicas de imagen despiertan grandes expectativas por sus aplicaciones potenciales. Primero, actualmente existe a nivel comercial una gran diversidad de sondas fluorescentes que permiten el análisis temporal de múltiples variables celulares, como son la concentración de calcio, el pH o el potencial de membrana; muchos equipos de registro permiten además la medida simultánea de varios de estos parámetros. Y en segundo lugar, algunas de las técnicas de imagen permiten un seguimiento temporal simultáneo en múltiples células del islote, lo cual es de una importancia crítica, dada las interacciones entre las mismas.

Limitaciones en el estudio de las células α, β y δ, mediante microscopia de fluorescencia convencional.

Las técnicas de imagen convencionales, si bien funcionan eficientemente para estudiar a nivel individual células disociadas (Berts y cols., 1995), presentan ciertas limitaciones para discriminar señales de fluorescencia individuales cuando las células se encuentran en un tejido, o en el caso que nos ocupa, el islote de Langerhans. Aunque el uso de objetivos de gran apertura numérica permite profundidades de campo por debajo de los 500 nm, favoreciendo un gran nivel de resolución axial, el principal problema de la microscopia de fluorescencia convencional es la información fuera de foco. Al iluminar un espécimen fluorescente de cierto espesor, no sólo se recoge fluorescencia de aquellos puntos situados en foco, sino también de planos adyacentes lejanos al de interés. Esta información fuera de foco contribuye a deteriorar la calidad de la imagen y la pérdida de contraste. Las fuentes de iluminación utilizadas, habitualmente lámparas de mercurio o xenón, contribuyen notablemente a esta información fuera de foco, ya que iluminan gran parte del espesor del espécimen y no selectivamente el plano de interés. Estas limitaciones técnicas previenen en gran medida el uso de metodologías convencionales de imagen en el análisis individualizado de las células del islote. Como hemos mencionado anteriormente, el islote está formado por alrededor de 1000-3000 células. La población mayoritaria, la célula β, se dispone en la parte central, aunque presenta ramificaciones que ocupan también parte de la zona periférica del islote. Mientras que este tipo celular está agrupado, pues las interacciones célula-célula son esenciales para su función, las células α y δ suelen presentarse desagrupadas formando un mosaico parcheado envuelto por la población β, y ocupando las zonas más periféricas (Bonner-Weir, 1991). En base a esta característica distribución espacial y a la contribución de la fluorescencia fuera de foco, no hay posibilidad de resolver la señal emitida por las células α y δ con técnicas convencionales. De este modo, la fluorescencia procedente del islote se corresponde con una señal "media" contaminada por la emisión de planos adyacentes al que se encuentra en foco, y que está totalmente dominada por la población mayoritaria de células β. Este hecho, como veremos más adelante, complica fundamentalmente las mediciones de las señales de Ca^{2+} procedentes de células individuales.

Para salvar estos obstáculos, se requieren técnicas que permitan eliminar esta información fuera de foco. El principio sobre el que se basa la microscopia confocal moderna fue patentado en 1957 por Marvin Minsky, pero pasaron varios años antes de que constituyera todo una revolución en el campo de la biomedicina. En gran medida, el empuje de la microscopia confocal ha estado altamente ligado al desarrollo tecnológico en múltiples facetas: láseres, componentes ópticos, sistemas de detección, sistemas informáticos, software, etc. La mayor contribución de la microscopia confocal, es sin duda, su capacidad para eliminar la fluorescencia fuera de foco, contribuyendo a una imagen de gran resolución. Para ello se enfoca sobre un punto de la muestra el haz de un láser que actúa como fuente puntual de iluminación, en vez de una fuente de excitación, como una lámpara de mercurio, que afecta a gran parte del espesor del espécimen. De esta manera, se contribuye a una menor excitación de puntos no situados en el plano focal. En segundo lugar, se coloca un pinhole o rendija confocal delante del sistema de detección que únicamente deja pasar la luz procedente de puntos localizados en el plano focal, pero obstruye el paso a la fluorescencia fuera de foco. Mediante un sistema de espejos controlados por el ordenador, el haz del láser escanea el espécimen y forma la imagen entera. El espesor de la sección óptica de la que se obtiene información se puede controlar con la variación del diámetro del pinhole. Una de las aplicaciones derivadas más habituales consiste en la reconstrucción de imágenes en 3 dimensiones mediante la obtención de secciones ópticas en el eje Z, procedimiento utilizado principalmente en estudios de morfología. Como veremos a continuación, la monitorización de parámetros celulares en secciones ópticas del islote constituye un avance importante en el estudio a nivel individual de las células endocrinas β y no-β en el islote.

Alternativamente, se han utilizado otros métodos para eliminar la información fuera de foco mediante el procesado digital de la imagen y el uso de algoritmos de deconvolución. En estos procedimientos, la información en foco y fuera de foco tiene

un tratamiento matemático, y se requiere conocer ciertos parámetros asociados a la óptica del sistema utilizado. Aunque estos métodos se han aplicado para observar gradientes locales de Ca^{2+} en células del islote aisladas en cultivo, todavía no se han aplicado al estudio de células en el islote intacto. Al margen de la microscopia de fluorescencia, en la célula β pancreática también se ha utilizado la técnica de la aequorina dirigida para medir la dinámica del Ca^{2+} en compartimentos intracelulares específicos. Recientemente, estos métodos se han aplicado para medir variaciones de Ca^{2+} en célula α y β en islote intacto utilizando adenovirus recombinantes que incorporan promotores específicos para cada tipo celular (Ishihara y cols., 2003).

La señal de Ca^{2+} en el islote de Langerhans.

Las variaciones de Ca^{2+} intracelular son un elemento clave en la vía de señalización en la célula β, que permite la secreción de insulina en respuesta a la glucosa (Prentki y Matchinsky, 1987). El metabolismo de la glucosa lleva a un incremento de la razón ATP/ADP, lo cual da lugar al bloqueo de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}) responsables del potencial de reposo en estas células. En consecuencia, se produce una despolarización que afecta a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, cuya apertura permite la entrada de Ca^{2+} extracelular. El incremento de Ca^{2+} citosólico es la señal que desencadena la secreción (Prentki y Matchinsky, 1987). Ante un estímulo prolongado, se produce una señal de calcio oscilatoria que da lugar a una liberación pulsátil de insulina. Aunque los mecanismos de acoplamiento estímulo-secreción en las células α y δ no están tan claros como en el caso de la célula β, existen importantes paralelismos. La información actual indica que el metabolismo de la glucosa también afecta a la actividad eléctrica de estas células, regulando así la función de diversos canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La señal de Ca^{2+} en estos tipos celulares también juega un papel fundamental para desencadenar la secreción de glucagón y somatostatina (Nadal y cols., 1999; Quesada y cols., 1999; Gopel y cols., 2000).

Durante los años 80 se realizaron multitud de trabajos en células aisladas estudiando la función del Ca^{2+} intracelular en la secreción de la célula β. Sin embargo, varios grupos confirmaron una heterogeneidad funcional de las células aisladas respecto al islote entero e intacto, anticipando la importancia del contacto célula-célula y de la regulación autocrina/paracrina para el correcto funcionamiento de la célula β. A principios de los 90 llegan los primeros estudios en el islote entero de la mano de grupos españoles (Valdeolmillos et al., 1989; Santos et al., 1991). Mediante microscopia de fluorescencia, técnicas de análisis de imagen y la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} Fura-2, demostraron en un estudio clásico en el campo (Santos et al., 1991) que el patrón oscilatorio de Ca^{2+} era consecuencia de la actividad eléctrica y que éste era sincrónico en todo el islote. Sin embargo, con estas técnicas ópticas convencionales, el comportamiento de las células α y δ pasa desapercibido.

En la figura 1A se muestra, a la izquierda, la imagen de un islote cargado con Fura-2 y adquirida con microscopia de fluorescencia convencional, mientras que a la derecha se ilustra la imagen de una sección óptica obtenida con microscopia confocal de otro islote cargado con Fluo-3. En general, las sondas fluorescentes en la forma acetoximetil éster presentan ciertos problemas de penetración cuando nos encontramos con especimenes de cierto grosor, quedando normalmente relegadas a las capas celulares más expuestas. Esto resulta evidente en la imagen de la sección óptica, pero no en aquella obtenida mediante fluorescencia convencional, donde la contribución de la fluorescencia fuera de foco no permite ver grandes diferencias de distribución de la sonda (Figura 1A). Afortunadamente, esto no constituye un problema para el análisis de las células, α, β y δ mediante microscopia confocal pues las tres poblaciones están representadas en la zona periférica del islote, y por tanto, la monitorización de su comportamiento individual resulta factible (Nadal y cols., 1999; Quesada y cols., 1999). En la figura 1B se muestra un registro de la señal de Ca^{2+} característica de un islote al pasar de una concentración de glucosa de 3 a 11 mM. En este caso, se utilizó microscopia convencional y la sonda Fura-2. Mediante esta técnica, la información fuera de foco impide resolver las señales procedentes de las células α, β y δ, de manera que se obtiene una señal "media" dominada por la célula β, la población mayoritaria. En cambio, la microscopia confocal y el análisis de los cambios de fluorescencia en secciones ópticas de 6-8 μm permite monitorizar las señales a nivel individual. Mediante esta técnica se pudo demostrar que el cambio de 3 a 11 mM glucosa induce diferentes patrones de señalización (Figura 1C) (Nadal y cols., 1999; Quesada y cols., 1999): por un lado se observó la señal característica de la célula β , pero además, se identificaron otras dos respuestas. Una población de células se encontraba activa a baja concentración de glucosa con una frecuencia oscilatoria pequeña y se silenciaba con el incremento del azúcar. Por otro lado, otra población generaba señales de Ca^{2+} a una frecuencia mayor, que apenas se modificaba con el cambio de glucosa. La utilización de técnicas inmunocitoquímicas en la misma sección óptica tras los registros de Ca^{2+} permitió correlacionar cada patrón de señalización con un tipo celular. El análisis de las señales de Ca^{2+} permitió, además, demostrar que sólo la población β está acoplada permitiendo un patrón sincrónico a modo de sincitio. Por el contrario, las células α y δ están desacopladas, lo cual les lleva a un funcionamiento individual autónomo en términos de señalización.

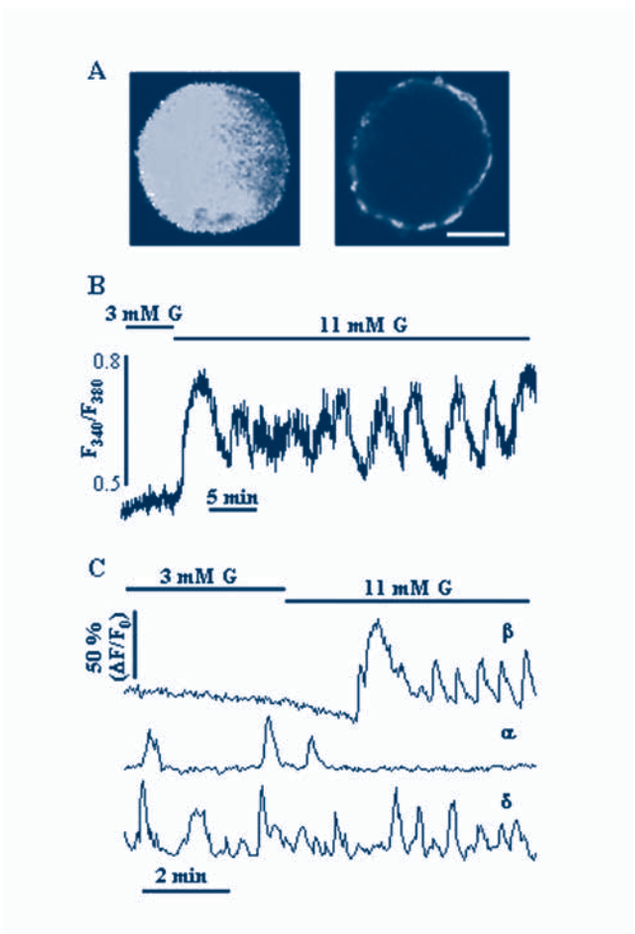


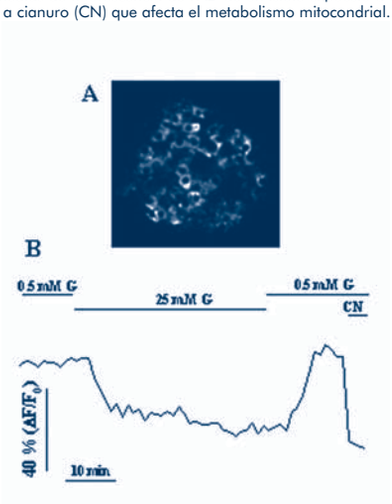
Figura 1. A, Imagen adquirida mediante microscopía de fluorescencia convencional de un islote cargado con la sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} Fura-2 (izquierda). Imagen obtenida con microscopía confocal de una sección óptica de 8 micras de un islote cargado con Fluo-3 (derecha). B, Oscilaciones de Ca^{2+} características de un islote al pasar a concentraciones estimulatorias (11 mM) de glucosa (G). Este registro representa la fluorescencia de un islote cargado con Fura-2 adquirida con microscopía convencional. C, Señales características de las células, α, β y δ al pasar de 3 a 11 mM glucosa. En este caso, se obtuvieron los registros mediante microscopía confocal y la utilización de la sonda fluorescente Fluo-3.

Medida de otros parámetros celulares: del potencial de membrana al estado metabólico.

La microscopia confocal aplicada al islote no sólo permite el

estudio de las señales de Ca^{2+} de las diferentes poblaciones, sino también el de otros parámetros celulares. Resultan de especial interés aquellas variables relacionadas con el acoplamiento estímulo-secreción. Se ha constatado que los tres tipos celulares presentan una actividad eléctrica específica y regulada por glucosa (Gopel y cols., 2000). Las señales de Ca^{2+} son consecuencia de esta actividad eléctrica. Recientemente, se ha utilizado la sonda fluorescente sensible a voltaje diBAC4(3) para monitorizar el efecto de la glucosa sobre el potencial de membrana de células α y β en islotes intactos (Hjortoe y cols., 2004). Este tipo de sonda es de respuesta lenta y da información únicamente del cambio medio del potencial de membrana. Estos estudios, realizados en islotes cultivados durante 1-2 semanas, han mostrado datos que difieren en cierta medida de los obtenidos con técnicas electrofisiológicas en islotes intactos frescos (utilizados 1-2 horas después de su extracción), que como ya hemos mencionado, tienen un comportamiento más cercano a la realidad fisiológica.

Figura 2. A, Imagen adquirida mediante microscopía confocal de una sección óptica de 2 micras de un islote. En este caso se recoge la fluorescencia procedente de las flavoproteínas. B, Durante la activación del ciclo de Krebs, parte de las moléculas de FAD pasan a la forma reducida $FADH_2$, mucho menos fluorescente. Mediante la medida de la fluorescencia intrínseca de estas moléculas, se puede monitorizar el estado metabólico celular. En la figura se ilustran las variaciones medias de fluorescencia de FAD de un islote expuesto a alta concentración de glucosa (G) y a cianuro (CN) que afecta el metabolismo mitocondrial.



Otra aplicación de la microscopia confocal es el estudio del estado metabólico en cada tipo celular mediante la monitorización de la fluorescencia de los pares $NAD(P)^+$/NAD(P)H y FAD/$FADH_2$ (microscopia confocal redox). Durante la activación del ciclo de Krebs, estas moléculas pasan de la forma oxidada a la reducida, sirviendo entonces como fuente de transferencia de electrones en la cadena de transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP. Mientras que, en el caso de $NAD(P)^+$, la intensidad de fluorescencia es mayor para la forma reducida, en el caso de FAD, la forma oxidada es la más fluorescente (Bennett y cols., 1996). El seguimiento de los cambios de fluorescencia de estas moléculas nos da una estimación cualitativa de la activación del metabolismo. Las moléculas de NAD(P)H se producen tanto a nivel de la glicólisis como del ciclo de Krebs, por lo que la señal procede del compartimiento citosólico y del mitocondrial. En cambio, la señal de FAD está asociada tan sólo a la mitocondria. Para realizar mediciones de la fluorescencia de NAD(P)H se requiere excitar en la región de ultravioleta (~360 nm), mientras que FAD presenta un amplio espectro de excitación en el visible (430-500 nm). Dado el alto coste de los láseres de ultravioleta, se suele optar por la medición de FAD con la línea 458 o 488 nm del láser de argón. En el caso de la célula β , la activación mitocondrial es fundamental en el acoplamiento estímulo-secreción y se observan cambios en la fluorescencia de $NAD(P)^+$ y FAD precediendo a la señal de Ca^{2+} que desencadena la secreción. Si bien se han realizado registros de autofluorescencia de célula β en secciones ópticas, estas medidas se obtuvieron de islotes cultivados durante varias semanas sobre una matriz extracelular (Bennett y cols., 1996), condiciones bastante alejadas de una situación fisiológica. Actualmente, nuestro grupo está realizando medidas de la actividad metabólica regulada por glucosa mediante microscopia confocal redox en las diferentes poblaciones en islotes intactos frescos, encontrando notables diferencias. En la figura 2 se muestra un ejemplo ilustrativo de las variaciones de fluorescencia procedentes de un islote sometido a un cambio en la concentración de glucosa.

Otra de las aplicaciones en el estudio del islote de Langerhans intacto es la posibilidad de realizar fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) en secciones ópticas. Esta técnica permite analizar el grado de acoplamiento célula-célula mediante el estudio de la transmisión de sondas fluorescentes, en general de bajo peso molecular, como la carboxifluoresceína. Los sistemas confocales actuales disponen de software que permite realizar rutinas de FRAP. El FRAP consiste en aumentar transitoriamente la intensidad del láser de forma selectiva en una célula o área de la misma, con el fin de producir un "apagamiento" (o photobleaching) de la sonda fluorescente. A continuación se monitoriza mediante la adquisición de imágenes la recuperación de la fluorescencia en la célula sometida a FRAP. Si existe acoplamiento entre dos células a través de gap junctions se produce una transferencia o redistribución de las moléculas de sonda fluorescente no sometidas a FRAP. El resultado final es una pequeña disminución de la fluorescencia de la célula o células acopladas que actúan como donantes, y por otro lado, un aumento de la señal en la célula sometida a photobleaching, que actúa como receptora del paso de moléculas fluorescentes. Utilizando técnicas eletrofisiológicas y FRAP en secciones ópticas de 8 μm en islotes intactos, se ha evaluado el grado de acoplamiento eléctrico y metabólico de la población β en islotes de ratones normales y de ratones transgénicos expresando conexina 32 (Quesada y cols., 2003). Los resultados obtenidos han aportado nuevas perspectivas acerca de los dominios de acoplamiento de la población β respecto a estudios previos utilizando técnicas invasivas.

La microscopia confocal, por tanto, permite el estudio simultáneo de diferentes poblaciones en el islote intacto, donde las técnicas convencionales carecen de resolución. La gran disponibilidad comercial de sondas fluorescentes sensibles a múltiples parámetros celulares ofrece la posibilidad de estudiar los mecanismos y vías de regulación en la fisiología de estos tipos celulares, en los que todavía existen grandes lagunas.

Agradecimientos:

Los trabajos de los autores que se mencionan en este artículo han sido financiados por el Ministerio Educación y Ciencia (BFU2004-07283).

Referencias:

-Bennett BD, Jetton TL, Ying G, Magnuson MA, Piston DW (1996) Quantitative subcellular imaging of glucose metabolism within intact pancreatic islets. J Biol Chem 271: 3647-3651.

-Berts A, Gylfe E, Hellman B (1995) Ca^{2+} oscillations in pancreatic islet cells secreting glucagon and somatostatin. Biochem Biophys Res Commun 208: 644-649.

-Bonner-Weir S (1991) Anatomy of the islet of Langerhans. In: The endocrine pancreas, edited by Ellis Samols, Raven Press, New York.

-Fernandez J, Valdeolmillos M (2000) Synchronous glucose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans recorded in vivo. FEBS Lett 477: 33-36.

-Gilon P, Jonas JC, Henquin JC (1994) Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets. Diabetologia 37: 1007-1014.

-Gopel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P (2000) Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting -cells in intact mouse pancreatic islets. J Physiol 528: 497-507.

-Gopel S, Zhang Q, Eliasson L, Ma XS, Galvanovskis J, Kanno T, Salehi A, Rorsman P (2004) Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. J Physiol 556: 711-726.

-Hjortoe GM, Hagel GM, Terry BR, Thastrup O, Arkhammar PO (2004) Functional identification and monitoring of individual alpha and beta cells in cultured mouse islets of Langerhans. Acta Diabetol 41: 185-193.

-Ishihara H, Maechler P, Gjinovci A, Herrera PL, Wollheim CB (2003) Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. Nat Cell Biol 5: 330-335.

-Nadal A, Quesada I, Soria B (1999) Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. J Physiol 517: 85-93.

-Prentki M, Matchinsky FM (1987) Ca^{2+}, cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. Physiol Rev 67: 1185-1248.

-Quesada I, Nadal A, Soria B (1999) Different effects of tolbutamide and diazoxide in, and cells within intact islets of Langerhans. Diabetes 48: 2390-2397.

-Quesada I., Fuentes E, Andreu E, Meda P, Nadal A, Soria B (2003) On-line analysis of gap junctions reveals more efficient electrical than dye coupling between islet cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 284: E980-987.

-Sanchez-Andres JV, Gomis A, Valdeolmillos M (1995) The electrical activity of mouse pancreatic beta-cells recorded in vivo shows glucose-dependent oscillations. J Physiol 486: 223-228.

-Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M. (1991) Widespread synchronous [Ca^{2+}]¡ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. Pflügers Arch 418: 417-422.

-Unger RH (1985) Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. Diabetologia 28: 574-578.

-Valdeolmillos M, Santos RM, Contreras D, Soria B, Rosario LM. (1989) Glucose-induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. FEBS Lett. 259(1):19-23.

Ivan Quesada,
Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández,
Ctra. N-332, Km.87, s/n
03550 Sant Joan d'Alacant
Phone: +34-96-591 9217; Fax: +34-96-591 9546
e-mail: ivanq@umh.es

ACTUALIZACIÓN

Hace casi 20 años, James W. Putney Jr. propuso que la entrada de Ca^{2+} secundaria a la activación celular en células no excitables se debía al vaciamiento de los depósitos intracelulares de calcio (Putney, 1986). Dos décadas después este modelo es plenamente aceptado aunque no se conoce con certeza ni el mecanismo de activación ni los propios canales de calcio implicados. Sin embargo, la investigación de esta propuesta ha fomentado nuevos descubrimientos sobre la homeostasis del calcio intracelular y el papel de este selecto catión en el control de múltiples funciones celulares desde la génesis de la vida hasta la muerte celular. También ha llevado a descubrir las proteínas TRP, una intrigante superfamilia de canales catiónicos implicados en múltiples funciones celulares. En esta breve revisión se repasan algunos acontecimientos históricos y la visión actual de un enigma llamado entrada capacitativa de calcio (ECC).

20 AÑOS DE LA ENTRADA CAPACITATIVA DE Ca^{2+}. Carlos Villalobos

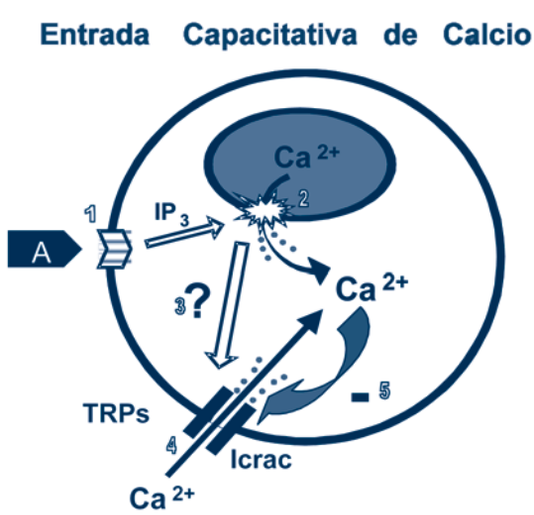
Introducción

Resulta sorprendente que un simple catión, el Ca^{2+}, sea capaz de regular tantos y tan diversos procesos celulares y fisiológicos como la contracción muscular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, la expresión génica, la diferenciación, proliferación y hasta la muerte celular. Al contrario que otros segundos mensajeros, el Ca^{2+}, como la energía, no se crea ni se destruye en la célula sino que simplemente se transporta desde el exterior extracelular o depósitos intracelulares hasta aquellos lugares donde se localizan los múltiples efectores del Ca^{2+}. Así pues, el estudio de la señal de Ca^{2+} es, en primer lugar, una cuestión de transporte. La concentración extracelular de Ca^{2+} es 10.000 veces superior a la intracelular. Este gran gradiente químico, junto al potencial negativo del interior celular, hace que exista un enorme gradiente electroquímico que favorece la entrada de Ca^{2+} a través de canales específicos. Existen múltiples tipos de canales de Ca^{2+} caracterizados por su mecanismo de activación ("gating") bien por voltaje (VOCCs), unión de ligandos extracelulares (ROCCs) o intracelulares (SMOCCs). La activación celular por hormonas, neurotransmisores u otros ligandos induce generalmente un cambio bifásico en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico ($[Ca^{2+}]_{cyt}$). A una primera fase transitoria debida a liberación de Ca^{2+} inducida por $InsP_3$ le sigue otra fase mantenida, frecuentemente asociada a oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{cyt}$, debida a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular. A mediados de los 80, se conocían muchos canales de Ca^{2+} en las células excitables pero todavía era un misterio el mecanismo por el que la activación celular inducía entrada de Ca^{2+} en las células no excitables. James W. Putney Jr (Putney, 1986) propuso que la entrada de Ca^{2+} estaba activada precisamente por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+}. Hoy día, este mecanismo de acción, llamado entrada capacitativa de Ca^{2+} (ECC) es considerada la vía más importante de entrada de Ca^{2+} en las células no excitables, aunque también participa en las células excitables, donde regula numerosas funciones celulares (Villalobos y García-Sancho, 1995). A pesar de los casi 20 años transcurridos, tanto el mecanismo de activación de la ECC como la identidad del canal o canales implicados son desconocidos.

Características de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+}.

Originalmente, Putney propuso que el vaciamiento de los depósitos inducía la entrada de Ca^{2+} directamente desde el medio extracelular a los depósitos y, desde estos, al citosol (Putney, 1986). Múltiples evidencias indicaron que los depósitos se rellenaban desde el citosol y no desde el medio extracelular, por lo que Putney tuvo que revisar su hipótesis (Putney, 1990). En el nuevo modelo, vigente hasta la fecha, el vaciamiento de los depósitos induce una señal que abre canales en la membrana plasmática lo que induce el aumento de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ y el rellenado de los depósitos que conduce al cierre de los canales de Ca^{2+}. Este modelo suponía una nueva visión porque la estimulación celular inducía la entrada de Ca^{2+} de un modo indirecto (Figura 1). De este modo, la señal que abre canales de Ca^{2+} no es la activación del receptor ni la generación de $InsP_3$ *per se*, sino el propio vaciamiento de los depósitos de Ca^{2+}.

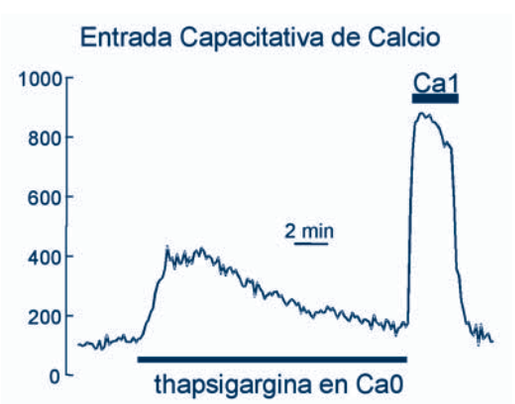
Figura 1. La Entrada Capacitativa de Ca^{2+}. La estimulación celular (1) con un agonista (A) induce la formación de IP, libera el contenido del Ca^{2+} almacenado en depósitos intracelulares (2). El vaciamiento de estos, induce una señal todavía desconocida (3,) que induce la apertura de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (4). Estos canales se han caracterizado como corrientes Icrac y podrían pertenecer a la superfamilia de canales catiónicos TRP. La entrada de Ca^{2+} se inactiva (-) de un modo dependiente de Ca^{2+}(5).



Numerosas estrategias que permiten depletar los depósitos de Ca^{2+} de un modo independiente de receptor o $InsP_3$ activan la ECC. Por ejemplo, los bloqueantes de la bomba de Ca^{2+} específica del retículo (thapsigargina, ácido ciclopiazónico), ionóforos (ionomicina) o la simple incubación en medio libre de Ca^{2+} y diálisis con tampones de Ca^{2+}. Posteriormente, se añadió una evidencia directa y se descubrió en mastocitos y otros tipos celulares que el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} inducía la aparición de una corriente de Ca^{2+} completamente nueva (Hoth y Penner, 1992) que se denominó Icrac de Ca^{2+}-release activated current. Icrac es una corriente independiente de voltaje y con una relación I/V característica. Tiene una gran amplitud a potenciales negativos que se aproxima a 0 a potenciales muy positivos (>+60 mV), lo que indica una gran selectividad por Ca^{2+}. Se estima que la selectividad de este canal por Ca^{2+} respecto a Na^{+} es 1000:1, similar a la de los VOCCs y que podría haber al menos 5.000 canales funcionales por célula. Icrac no es la única corriente descrita que se activa por el vaciamiento de los depósitos intracelulares. En los últimos años se han descrito otras corrientes activadas por vaciamiento de los depósitos que se han llamado SOC, de store-operated channels y que presentan propiedades electrofisiológicas diferentes, lo que sugiere que la ECC está mediada por una familia de canales más que por un único canal.

Durante años, se ha llevado a cabo una intensa búsqueda de drogas capaces de bloquear selectivamente la ECC, Icrac y otros canales SOC. Se descubrió que toda una serie de inhibidores de citocromo P_{450} bloqueaba con afinidad media (M) la ECC (García-Sancho et al., 1992). Ello llevó a establecer un modelo por el que citocromo P_{450} podría mediar entre el vaciado de los depósitos y la activación de la ECC (Alvarez et al., 1992). Sin embargo, resultó que estas drogas también inhiben con una afinidad similar otros canales iónicos (Villalobos et al., 1992) lo que, aunque cuestionó el modelo, sugería ciertas similitudes estructurales entre la ECC y otros canales de Ca^{2+} (García-Sancho et al., 1992). Existen múltiples drogas capaces de bloquear la ECC pero ninguna de ellas es totalmente específica, aunque el reciente desarrollo de derivados de pirazol es muy prometedor.
La ECC puede ponerse de manifiesto de dos maneras. De un modo indirecto, mediante la medida de Ca^{2+} intracelular con colorantes fluorescentes, o mediante la medida directa de corrientes activadas por vaciamiento de depósitos mediante "Patch Clamp". Para las medidas de Ca^{2+} intracelular se vacían los depósitos intracelulares con thapsigargina en medio libre de Ca^{2+} y, tras el vaciado de los depósitos, se añade Ca^{2+} al medio extracelular lo que provoca un gran aumento de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (Ca^{2+} overshoot), evidencia de la ECC (Figura 2). Ni las medidas de Ca^{2+} intracelular ni las de corrientes están exentas de problemas de interpretación por lo que se recomienda recurrir a ambos tipos de medidas.

Figura 2. Medida de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+}. Registro de la concentración de Ca^{2+} intracelular en células HT29 cargadas con el colorante fluorescente fura-2. La adición de thapsigargina en medio libre de Ca^{2+} (Ca0) induce la liberación de Ca^{2+} almacenado en depósitos. La adición de Ca^{2+} extracelular (Ca1) induce la entrada capacitativa de Ca^{2+} (Ca^{2+} overshoot) que no se produce en células no tratadas previamente con thapsigargina.



Papel Fisiológico de la Entrada Capacitativa de Ca^{2+}

La ECC se considera actualmente un mecanismo ubicuo y la ruta de entrada de Ca^{2+} más importante en células no excitables, aunque también podría participar en la activación de células excitables. El papel fisiológico más importante de la ECC es la generación de señales de Ca^{2+} inducidas por la activación de receptores acoplados a la hidrólisis de fosfatidil-inositol. Se podrían distinguir 3 papeles genuinos de la ECC (Parekh y Putney, 2005). En primer lugar, la ECC permite el rápido rellenado de los depósitos intracelulares de Ca^{2+}. El mantenimiento de unos niveles suficientes de Ca^{2+} en éstos es esencial para la maduración proteica y evitar la activación de señales de estrés. En segundo lugar, la ECC permite mantener niveles elevados de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ a largo plazo, lo cual es relevante para múltiples funciones celulares, como el tono muscular del músculo liso y la activación del factor de transcripción NFAT que regula la expresión de citoquinas y la proliferación y supervivencia celulares. Finalmente, la ECC es un componente esencial para la generación de oscilaciones de Ca^{2+} ya que permite el rellenado de los depósitos y la liberación periódica del Ca^{2+} de estos, uno de los mecanismos de generación de oscilaciones de $[Ca^{2+}]_{cyt}$. Se ha propuesto que la ECC es esencial en el control de la exocitosis regulada y en el control de la actividad de muchos enzimas Ca^{2+}-dependientes como adenilatociclasa, NO sintasa, fosfolipasas y otras múltiples enzimas reguladas por Ca^{2+}, calmodulina o fosforilación dependiente de Ca^{2+}. Otras funciones celulares en las que la ECC es esencial son los procesos quimiotácticos del esperma, la reacción acrosomal y el control del ciclo celular y de la proliferación celular. Por ejemplo, la entrada en el ciclo celular es precedida por ECC. Múltiples factores de crecimiento con actividad mitogénica inducen la ECC. Además, la inhibición de la ECC por diferentes medios previene la proliferación celular. Finalmente, la ECC podría jugar un papel esencial en la muerte celular por apoptosis. Así, las múltiples funciones reguladas por la ECC reflejan la relevancia del ión Ca^{2+} en muchos procesos, tanto a corto como a largo plazo (Parekh y Putney, 2005).

Mecanismo de Activación

La propuesta original de Putney postulaba que el Ca^{2+} extracelular rellenaba directamente el depósito intracelular de Ca^{2+} (Putney, 1986). Sin embargo, las evidencias experimentales indicaban que el rellenado de los depósitos ocurría desde el citosol, lo que implica la existencia de una señal retrógrada entre el nivel de llenado de los depósitos y los canales de la membrana plasmática. Ello requiere en primer lugar la existencia de un sensor de Ca^{2+} capaz de sentir el contenido de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. En segundo lugar una señal de activación de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática. En cuanto al sensor de Ca^{2+} no se conoce nada excepto que No es calreticulina, la proteína intraluminal más abundante del retículo endoplásmico. En cuanto al mecanismo de activación se han propuesto 3 modelos (Parekh y Putney, 2005). El modelo de fusión vesicular propone que la activación de la ECC se debe a la estimulación de la incorporación de nuevos canales de Ca^{2+} desde vesículas intracelulares similares a los gránulos de secreción a la membrana plasmática. Este modelo es muy sugerente y similar a la activación de otros procesos de transporte pero no predice la interacción con el nivel de llenado de los depósitos. El modelo del acoplamiento conformacional propone que los receptores de $InsP_3$ llevarían a cabo una interacción "íntima" con canales en la membrana plasmática de un modo similar a la interacción de los receptores de dihidropiridinas y el receptor de rianodina en el músculo esquelético. Finalmente, el modelo del mensajero difusible, en el que el vaciamiento de los depósitos genera un factor soluble, llamado CIF de "calcium influx factor", capaz de abrir canales en la membrana plasmática. Existen evidencias recientes que apuntan a un papel de la fosfolipasa A_2 independiente de Ca^{2+} en la activación de la entrada capacitativa de Ca^{2+}. Sin embargo, las evidencias en la literatura no parecen concluyentes con ninguno de los 3 modelos de modo universal así que cabe

la posibilidad de que existan múltiples modos de activación de la ECC y que incluso puedan coexistir en la misma célula.

La Superfamilia de Canales TRP.

Durante años no se conocieron las bases moleculares de los canales implicados en la ECC. Curiosamente, todo cambió gracias a una mosca ciega. La foto-transducción en Drosófila requiere la hidrólisis de fosfatidil-inositoles, entrada de Ca^{2+} y un cambio mantenido del potencial durante el estímulo luminoso. El mutante TRP de Drosófila (de transient receptor potencial) presentaba un cambio transitorio del potencial y defectos en la entrada de Ca^{2+} y foto-transducción. Pronto se vio que el gen TRP era esencial para la entrada de Ca^{2+} (Hardie y Minke, 1992) y codificaba para algo parecido a canal de Ca^{2+} sin sensor de voltaje, lo que llevó a la hipótesis de que podía ser el canal implicado en la ECC. Comenzó entonces una caza de homólogos de TRP en vertebrados que llevó al descubrimiento de la superfamilia de canales TRP (Clapham et al., 2001). Actualmente, esta familia de proteínas está formada por 3 grupos: La familia de canales TRPC o canónicos TRPC1-TRPC7 muy similares al gen TRP de Drosófila; los 6 miembros de la familia TRPV (TRPV1-V6) así llamada por contener al receptor vaniloide y, finalmente, la familia TRPM con 8 miembros (TRPM1-M8) que contiene a melastatina. Se cree que los canales TRP están formados por homo o hetero-tetrámeros de subunidades que contienen 6 dominios trans-membranales con un poro hipotético entre los segmentos 5 y 6 y dominios intracelulares N y C terminales (Clapham, 2003). Experimentos de sobre-expresión de TRPs, RNA de interferencia y "knock down" sugieren que algunos miembros de la familia TRPC podrían formar parte de la ECC. Además, TRPV6, el canal de Ca^{2+} de los epitelios absortivos regulado por vitamina D, también podría ser o contribuir al canal SOC. Curiosamente, el canal TRPV6 muestra una enorme selectividad por Ca^{2+} y muchas propiedades electrofisiológicas similares a Icrac (Parekh y Putney, 2005). Sin embargo, por cada trabajo que propone que un TRP en particular es o participa de ECC, existe otro similar que afirma lo contrario (Clapham, 2003) y no existe consenso actualmente sobre la identidad molecular de la ECC. La función de los canales TRP parece exceder a la de la ECC. Así, se ha propuesto que los canales TRP actuarían como sensores celulares capaces de sentir cambios en el entorno extracelular e intracelular de temperatura, pH, calcio, presión osmótica, etc. En los próximos años se prevé el descubrimiento de nuevos canales TRP y su implicación en importantes funciones fisiológicas.

Papel de la Mitocondria en la Entrada Capacitativa de Calcio

Una de las propiedades más importantes de la entrada capacitativa de Ca^{2+}, de la corriente Icrac, y de algunos canales TRP es la inactivación por Ca^{2+}. Se han descrito 3 modos de inactivación (Parekh y Putney, 2005): una inactivación rápida debida seguramente a cambios locales de $[Ca^{2+}]$ en el entorno del canal, una inactivación más lenta probablemente mediada por calmodulina y una tercer proceso, también lento, por el que el rellenado de los depósitos intracelular conduce al cierre de los canales de Ca^{2+}. De este modo, los sistemas de extrusión de Ca^{2+} son muy importantes para mantener la ECC. Uno de los sistemas más importantes de extrusión de Ca^{2+} es la mitocondria. La mitocondria es capaz de captar enormes cantidades de Ca^{2+} siempre que se generen microdominios de $[Ca^{2+}]$ lo suficientemente elevados para activar el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial. De hecho, el uso de sondas de calcio basadas en proteínas (aecuorina) dirigidas a la mitocondria ha revelado que la mitocondria sufre cambios de la $[Ca^{2+}]$ en el rango mM (Montero et al., 2000). Un estudio reciente sugiere que, en realidad, esencialmente todo el Ca^{2+} que entra por canales es retirado por la mitocondria (Villalobos et al., 2002). Una serie de trabajos ha mostrado el papel clave de la mitocondria en el control de la ECC. El colapso del potencial mitocondrial que inhibe la fuerza electromotriz para la captación de Ca^{2+} por la mitocondria, hace que el Ca^{2+} entrante no sea retirado por la mitocondria lo que inactiva la ECC (Hoth et al., 1997). Algo similar ocurre durante la liberación de Ca^{2+} que es potenciada por la captación mitocondrial de Ca^{2+} lo que permite que el depósito de Ca^{2+} se deplete más eficazmente y sea enviada la señal de activación de la ECC (Gilabert y Parekh, 2000). Así pues, la mitocondria juega un doble papel en el control de la ECC, por un lado facilita su activación al favorecer el vaciamiento del depósito y, además, impide su inactivación, al retirar el Ca^{2+} a medida que entra a la célula. Así, un nuevo orgánulo, la mitocondria, se suma al control de la ECC: de hecho, la ECC está regulada por la interacción dinámica entre los flujos de Ca^{2+} de la membrana plasmática, el retículo endoplásmico y la mitocondria (Parekh, 2003).

Estoy convencido de que no tendremos que esperar otros 20 años para saber con certeza tanto el mecanismo de activación de la ECC como la identidad de los canales implicados. Aunque así fuera, por el camino se revelarían, con toda seguridad, otros aspectos desconocidos de la señal de calcio y su papel en el control de múltiples funciones celulares.

Referencias

-Alvarez J, Montero M, García-Sancho J (1992) Cytochrome P_{450} may regulate plasma membrane Ca^{2+} permeability according to the filling state of the intracellular Ca^{2+} stores. *FASEB J* 6: 786-792.

-Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524

-Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family *Nature Rev* 2: 387-396.

-García-Sancho J, Alvarez J, Montero M, Villalobos C (1992) Ca^{2+} influx following receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 13: 12-13.

-Gilabert JA, Parekh AB. (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca^{2+} current Icrac. *EMBO J* 19: 6401-6407.

-Hardie RC, Minke B (1992) The TRP gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 8: 643-651.

-Hoth M, Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355: 353-356.

-Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137: 633-648.

-Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, García AG, García-Sancho J, Alvarez J (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2: 57-61.

-Parekh AB (2003) Store-operated Ca^{2+} entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol* 547: 333-348.

-Parekh AB, Putney JW Jr (2005) Store-operated calcium channels. Physiol Rev 85: 757-810.

-Putney JW Jr (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1-12.

-Putney JW Jr (1990) Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11: 611-624.

-Villalobos C, Fonteriz R, Lopez MG, García AG, García-Sancho J (1992) Inhibition of voltage-gated Ca^{2+} entry into GH_3 and chromaffin cells by imidazole antimycotics and other cytochrome P_{450} blockers. *FASEB J* 6: 2742-2747.

-Villalobos C, Garcia-Sancho J (1995) Capacitative Ca^{2+} entry contributes to the Ca^{2+} influx induced by thyrotropin-releasing hormone (TRH) in GH_3 pituitary cells. *Pflügers Arch*. 430: 923-935.

-Villalobos C, Núñez L, Montero M, García AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J and García-Sancho J (2002) Redistribution of Ca^{2+} among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16, 343-353.

Carlos Villalobos
Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM), Universidad de Valladolid y Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). 47005 Valladolid. carlosv@ibgm.uva.es

El estudio de las acciones de la aldosterona ha experimentado una auténtica revolución en los últimos diez años. Numerosos experimentos sugieren que el retrato clásico de esta hormona actuando exclusivamente como un mineralocorticoide a través de su receptor genómico en tejidos epiteliales es, cuanto menos, incompleto. Si bien no cabe duda alguna sobre la gran importancia de la aldosterona como mineralocorticoide, existen un gran número de preguntas por contestar acerca de los mecanismos de acción de esta hormona, de sus posibles funciones adicionales y de la biología de su receptor.

ALDOSTERONA: ¿ALGO MÁS QUE UN MINERALOCORTICOIDE?.

Diego Alvarez de la Rosa

El estudio de las acciones de la aldosterona ha experimentado una auténtica revolución en los últimos diez años. Numerosos experimentos sugieren que el retrato clásico de esta hormona actuando exclusivamente como un mineralocorticoide a través de su receptor genómico en tejidos epiteliales es, cuanto menos, incompleto. Si bien no cabe duda alguna sobre la gran importancia de la aldosterona como mineralocorticoide, existen un gran número de preguntas por contestar acerca de los mecanismos de acción de esta hormona, de sus posibles funciones adicionales y de la biología de su receptor.

La identificación de factores con actividad mineralocorticoide generó gran interés entre los fisiólogos durante la primera mitad del siglo XX. Dichos factores promueven la retención de Na^+ y agua y la excreción de K^+ en el organismo, actividades llevadas a cabo fundamentalmente en el riñón. La identificación de la aldosterona, una hormona esteroidea producida por la glándula adrenal, como el principal mineralocorticoide fue uno de los grandes avances en la fisiología de los años 50 . A raíz de este descubrimiento y durante las últimas cinco décadas, la comprensión de la fisiología, bioquímica y biología molecular de la aldosterona y su acción mineralocorticoide ha sido objeto de un intenso esfuerzo de investigación. Así, actualmente sabemos que la aldosterona lleva a cabo su función mediante la activación del transporte transepitelial de Na^+ en el túbulo distal del riñón y de otros órganos con epitelios capaces de reabsorber Na^+, como son el colon, las glándulas salivares y las glándulas sudoríparas. A su vez, el transporte vectorial de Na^+ crea un gradiente eléctrico transepitelial imprescindible para la secreción de K^+ y H^+, de forma que estos tres procesos quedan unidos funcionalmente.

La aldosterona se sintetiza en la zona glomerular de la corteza de la glándula adrenal, en respuesta principalmente a la angiotensina II, producto de la activación del eje renina-angiotensina debido a una disminución en el volumen circulante efectivo, y al aumento en los niveles de K^+ en plasma . Una vez secretada a la sangre la aldosterona llega a sus órganos diana donde, debido a su naturaleza esteroidea, difunde libremente a través de la membrana plasmática de las células para unirse a su receptor intracelular. El receptor de aldosterona, más conocido como receptor de mineralocorticoides (MR) forma parte de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas y tiroideas, que ejercen su función actuando como factores de transcripción en el núcleo. En estado inactivo el MR se encuentra en el citoplasma formando parte de un complejo multiproteico que incluye la proteína de choque térmico de 90 kDa (Hsp90). Tras la unión de la aldosterona, este complejo se disgrega, permitiendo la translocación del MR al núcleo, donde interactúa con el DNA y con una serie de cofactores proteicos para modular la expresión de genes implicados en la regulación del transporte transepitelial de Na^+. Pese a que la naturaleza de dichos genes ha sido objeto de intenso estudio, su identidad es sólo parcialmente conocida; esto se debe principalmente a que la secuencia consenso de unión del MR a DNA es poco específica, siendo muy similar a la de otros receptores de la misma familia. De hecho, esta secuencia consenso, denominada "elemento de respuesta a esteroides (SRE), es común al MR y a los receptores de glucocorticoides, progesterona y andrógenos. Se piensa que la especificidad del MR *in vivo* viene dada por la interacción del receptor con otros factores de transcripción y con elementos de remodelación de la cromatina .

El transporte transepitelial de Na^+ se efectúa gracias a la actividad del canal epitelial de Na^+ (ENaC) en la membrana apical, que introduce Na^+ desde el lumen del túbulo hasta el citoplasma, y de la Na^+,K^+-ATPasa en la membrana basolateral, que transloca iones Na^+ desde el citoplasma hasta el intersticio en un proceso dependiente de energía. El paso limitante de esta ruta lo constituye ENaC, y por tanto este canal es la diana de numerosos mecanismos reguladores , siendo la aldosterona el más importante de ellos. Dado que el transporte transepitelial de Na^+ (y por tanto la excreción de K^+ y H^+) depende de forma estricta de la actividad de ENaC y de Na^+,K^+-ATPasa, los genes que codifican estos sistemas de transporte fueron considerados los principales candidatos a ser las dianas del MR. Tras la identificación y clonaje de las secuencias codificantes de las subunidades de ENaC y Na^+,K^+-ATPasa durante los años 80 y 90, se comprobó que si bien la aldosterona, a través del MR, es capaz de regular la expresión de algunas de sus subunidades en determinadas condiciones, los patrones de regulación no pueden por sí solos explicar la acción de la hormona. La identificación de otros genes regulados por aldosterona y cuyos productos activen a su vez el transporte mediado por ENaC y Na^+,K^+-ATPasa continúa siendo objeto de intenso estudio y no poca controversia. Recientemente, se ha propuesto que uno de estos genes podría ser la isoforma 1 de la quinasa dependiente de suero y glucocorticoides (SGK1). La co-expresión de esta quinasa con ENaC en sistemas heterólogos aumenta la actividad del canal, si bien sus mecanismos de acción son diferentes a los de a la aldosterona; estos resultados parecen indicar que SGK1 participa en otras vías de regulación de ENaC independientes de la aldosterona .

La existencia de distintas enfermedades caracterizadas por defectos en la síntesis o secreción de aldosterona por la glándula adrenal, o bien por la existencia de mutaciones en componentes de la ruta de acción de la hormona, incluyendo ENaC y el MR, confirma la importancia de la acción mineralocorticoide de la aldosterona en la homeostasis del Na^+ y del K^+ y en el control de la presión arterial en humanos. Estos defectos y mutaciones pueden provocar hipertensión en los casos en que los niveles de aldosterona están anormalmente elevados o su ruta de señalización excesivamente activada, o bien hipotensión debido a los fenómenos opuestos .

Si bien esta breve descripción de la acción y relevancia fisiopatológica de la aldosterona continúa siendo aceptada, en los últimos años se ha comprobado que es incompleta. La posibilidad de que esta hormona tenga otras acciones independientes de su actividad estrictamente mineralocorticoide se ha sugerido en base a al menos cuatro observaciones: 1) el MR se expresa en células no epiteliales; 2) se ha detectado producción de aldosterona en corazón y sistema nervioso central con posible actuación paracrina de la hormona; 3) la aldosterona tiene acciones independientes de la síntesis de nuevas proteínas (efectos no genómicos) en numerosos tipos celulares, a pesar de que su acción mineralocorticoide depende mayoritariamente de la acción del MR como factor de transcripción; 4) niveles anormalmente altos de aldosterona en relación al estatus salino tienen efectos deletéreos sobre el sistema cardiovascular, independientemente de que existan variaciones en la presión arterial. A continuación se discuten estas observaciones y sus posibles repercusiones con mayor detalle.

Tras el clonaje del MR se comprobó mediante distintas técnicas inmunológicas y de biología molecular que este receptor también se expresa en células no epiteliales que incluyen, entre otras, células tan diversas como los cardiomiocitos (Fig. 1), las células del músculo liso de la pared vascular (VSMC), células

endoteliales de los grandes vasos, neuronas hipotalámicas, queratinocitos y adipocitos .

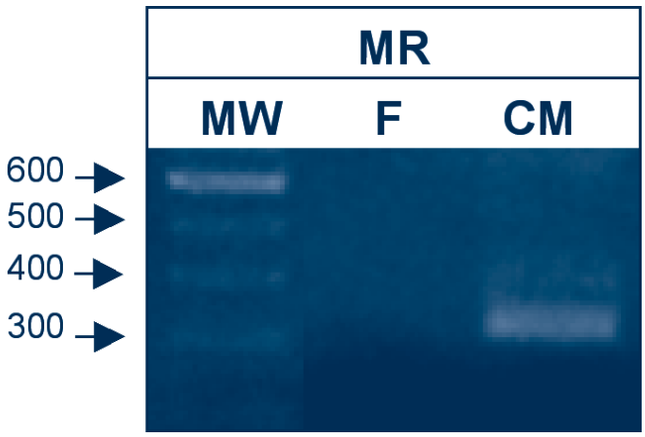


Figura 1. Expresión del receptor de mineralocorticoides (MR) en cardiomiocitos neonatales de ratón. Se prepararon cultivos primarios de cardiomiocitos y de fibroblastos a partir de ventrículos derechos aislados de corazones de ratones neonatos. La separación de cardiomiocitos y fibroblastos se realizó mediante plaqueo diferencial. Tras 24 h en cultivo, se obtuvo RNA total a partir de ambos tipos de cultivos y se utilizaron 5 g para obtener cDNA mediante transcripción inversa. La presencia del MR se comprobó amplificando una región de 320 pb mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos que hibridan en exones contiguos. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.2%. Como se puede observar, el mRNA del MR se expresa en cardiomiocitos (CM), pero no en fibroblastos (F) en cultivo primario.

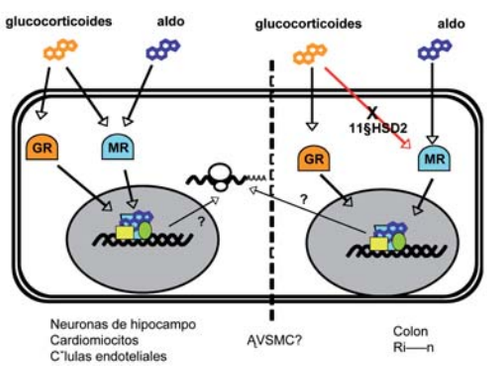


Figura 2. Acción de la 11--hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 (11HSD2) sobre la especificidad de activación del MR. Tanto la aldosterona (aldo) como los glucocorticoides son capaces de difundir libremente a través de la membrana plasmática y unirse a sus receptores intracelulares. En células epiteliales del colon y riñón, la expresión de la 11HSD2 metaboliza los glucocorticoides y los convierte en análogos sin interacción apreciable con el MR. Por el contrario, en neuronas de hipocampo, cardiomiocitos y células endoteliales, no hay expresión de 11HSD2 y por tanto los glucocorticoides pueden unirse tanto a su receptor (GR) como al MR. Ambos receptores, tras la unión de sus ligandos, son translocados al núcleo, llevando a cabo su función como factores de transcripción y modulando la expresión de genes cuya identidad es poco conocida. En el caso de las células del músculo liso vascular (VSMC), la expresión de la 11HSD2 es baja y sus consecuencias funcionales no están bien establecidas.

Estos experimentos confirmaron observaciones anteriores basadas en la utilización de aldosterona marcada radiactivamente. Este conjunto de datos no deja lugar a dudas respecto a la expresión extraepitelial del MR, pero antes de poder postular que la aldosterona actúa sobre estas células, es necesario aclarar algunos aspectos peculiares sobre la especificidad del MR. La expresión funcional del MR en sistemas heterólogos demostró que los glucocorticoides más comunes en mamíferos (cortisol y, en roedores, corticosterona) son capaces de unirse al MR con igual afinidad que la aldosterona (K_d = 0.5-2 nM), si bien su potencia como activadores es inferior a la de ésta. La unión de alta afinidad de los glucocorticoides al MR es especialmente sorprendente si se tiene en cuenta que la unión de estas hormonas al receptor de glucocorticoides (GR) es de menor afinidad (K_d = 40-50 nM). Teniendo en cuenta que la concentración de glucocorticoides en sangre es entre cien y mil veces superior a la de aldosterona (0.1-1 nM), este resultado implicaría que el MR estaría permanentemente ocupado y activado por glucocorticoides. Evidentemente esto no es compatible con la acción de la aldosterona como mineralocorticoide. Se han propuesto numerosos mecanismos que confieren selectividad al MR, de forma que el receptor esté "protegido" de las altas concentraciones circulantes de glucocorticoides . La importancia relativa de estos mecanismos varía probablemente en función del tipo celular estudiado, pero comúnmente se acepta que el mecanismo predominante es la expresión por las células diana de aldosterona de la enzima 11--hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 2 (11HSD2), que metaboliza cortisol en una reacción dependiente de NAD convirtiéndolo en cortisona, que no interaccionan con el MR (Fig. 2).

Esta enzima está presente en las células principales del túbulo distal del riñón y en células epiteliales del colon, dianas clásicas de la aldosterona. Su expresión y actividad es también detectable en VSMC, pero es inexistente en otras células con expresión del MR, como pueden ser cardiomiocitos o neuronas de hipocampo. Aún en las células con expresión de 11HSD2, se ha calculado que en condiciones fisiológicas la enzima metaboliza el 90% del cortisol disponible, lo que hace que potencialmente la concentración de este esteroide en el citoplasma sea aún unas 10 veces superior a la de la aldosterona. Esto hace sospechar que a pesar de que la afinidad por el MR de ambos esteroides es similar, podrían existir otros mecanismos que impiden que los complejos MR-cortisol sean activos. En células sin expresión de 11HSD2 es difícil aceptar que el MR actúe como receptor de aldosterona en condiciones fisiológicas, dada la dificultad que tendría la hormona en desplazar al cortisol, que se encuentra a concentraciones mucho más elevadas. En su lugar, se ha propuesto que el MR podría tener un papel fisiológico adicional como receptor de glucocorticoides de alta afinidad y que ésta fue originalmente su función antes de la aparición de la aldosterona en la evolución de los animales. La adquisición de la aldosterona y su actividad como mineralocorticoide es un hecho evolutivamente reciente, ya que es necesaria sólo en animales terrestres, obligados por el ambiente a desarrollar mecanismos para retener Na^+ y agua. Un dato que apoya la hipótesis del origen del MR como receptor de glucocorticoides es la identificación de proteínas con alta homología de secuencia con el MR en peces, tanto en teleósteos como en elasmobranquios (Alvarez de la Rosa D., datos sin publicar), animales que no producen aldosterona y cuyos mecanismos de homeostasis del Na^+ son muy diferentes a los de los animales terrestres. En estos casos, la máxima expresión del MR se encuentra en el cerebro, donde se postula que, al igual que en células de mamífero sin expresión de 11HSD2, actuaría como un receptor de glucocorticoides de alta afinidad. La principal crítica a esta hipótesis es que el MR constituiría entonces un receptor de glucocorticoides con una afinidad entre dos y cuatro órdenes de magnitud superior a las concentraciones típicas de su ligando en sangre. La utilidad fisiológica de un receptor con estas características es dudosa.

Un mecanismo que podría permitir al MR ejercer como receptor de aldosterona en células que no expresan 11HSD2 sería la presencia de altas concentraciones locales de esta hormona producida en los tejidos diana, actuando así de forma autocrina o paracrina. Hasta el momento se ha descrito la producción extra-adrenal de aldosterona en dos tejidos diferentes, corazón y sistema nervioso central. Si bien estas observaciones dieron lugar a un entusiasmo considerable, la producción de aldosterona por el tejido cardiaco ha sido puesta en entredicho debido a la falta de reproducibilidad de los resultados comunicados inicialmente. En los últimos meses, varios trabajos publicados por el grupo de los Dres. Celso y Elise Gómez-Sánchez (Universidad de Mississippi) utilizando técnicas de alta sensibilidad para la detección de la expresión y actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de aldosterona parecen descartar la producción cardiaca de esta hormona, si bien apoyan la idea de una producción limitada en el sistema nervioso central de la rata . Esto es consistente con el hecho de que en animales adrenalectomizados no existe aldosterona detectable en sangre. La pequeña producción de aldosterona en el sistema nervioso central ejercería entonces una función autocrina o paracrina, activando el MR expresado en neuronas

del hipocampo, si bien es difícil imaginar cómo esta pequeña producción sería capaz de competir con los elevados niveles de glucocorticoides, que son altamente permeables a través de la barrera hematoencefálica.

Sabemos que al igual que otros esteroides, la aldosterona es capaz de provocar respuestas celulares sin modular necesariamente la expresión de ningún gen . Este tipo de respuestas, denominadas no genómicas, son detectables en gran diversidad de tipos celulares y se caracterizan, además de su independencia de la transcripción y traducción de nuevas proteínas, por su rapidez de acción (en el rango de pocos minutos). Se ha demostrado que la aldosterona, a través de mecanismos no genómicos, puede producir, entre otros efectos, una alcalinización del citoplasma debido a la activación del cotransportador de Na^+ y H^+, un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, activación de algunas isoformas de protein kinasa C, aumento en la producción de AMPC, etc . La existencia de acciones no genómicas de la aldosterona fue inicialmente polémica, pero actualmente goza de aceptación generalizada. La naturaleza del receptor implicado en las respuestas no genómicas es desconocida. En algunos casos se ha sugerido que el receptor "clásico" de mineralocorticoides, el MR, podría estar implicado, si bien la principal dificultad en la interpretación de los trabajos publicados reside en la falta de reproducibilidad de los datos obtenidos con distintos antagonistas farmacológicos de este receptor. La escasa información existente en torno al receptor implicado en las acciones no genómicas de la aldosterona dificulta enormemente la determinación de la importancia fisiológica de este tipo de señalización. Algunos autores han sugerido que los mecanismos no genómicos contribuyen a la acción mineralocorticoide de la aldosterona en colon y riñón, pero esta idea goza de poco crédito dado que es difícil encajar los efectos no genómicos con los genómicos en un relato coherente del efecto mineralocorticoide en estos tejidos. Por otra parte, se ha propuesto que mediante mecanismos no genómicos, especialmente la elevación del pH y Ca^{2+} intracelulares, la aldosterona podría contribuir a la adaptación rápida del tono de la pared vascular a variaciones en la presión arterial debidas a cambios posturales/pérdida de volumen, actuando conjuntamente con la descarga simpática y la acción de la angiotensina .

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que niveles anormalmente altos de aldosterona en relación a la ingestión de Na^+ producen efectos deletéreos en el sistema cardiovascular aparentemente de forma independiente de cambios en la presión arterial. Estos efectos incluyen hipertrofia cardiaca y fibrosis perivascular e intersticial. El descubrimiento de los efectos deletéreos que tienen los niveles anormalmente elevados de aldosterona en animales sugirió que el empleo de antagonistas del MR podría ser útil en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca en humanos, donde también se detecta hipertrofia y fibrosis. Se ha observado que cuando la producción de angiotensina II se bloquea farmacológicamente en estos pacientes, los niveles inicialmente bajos de aldosterona vuelven a su valor original o incluso alcanzan valores superiores. Basado en estos razonamientos, el ensayo clínico RALES (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) demostró que la administración continua de dosis moderadas del antagonista del MR espironolactona (Aldactone), combinado con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, mejora la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardiaca grave un 30% en 3 años. Los efectos beneficiosos del tratamiento con antagonistas del MR fueron confirmados en un ensayo clínico posterior, EPHESUS, que empleó eplerenona, un nuevo antagonista del MR con especificidad superior a la espironolactona. Tanto los experimentos con modelos animales como los ensayos clínicos mencionados han hecho que se generalice la idea de que la aldosterona tiene una participación directa y destacada en la fisiopatología del sistema cardiovascular. Sin embargo, estas observaciones se limitan a demostrar dos hechos. El primero es que la aldosterona tiene efectos deletéreos sobre el sistema cardiovascular cuando los niveles de esta hormona son inapropiados para los niveles de Na^+, independientemente de variaciones en la presión sanguínea. En ausencia de niveles elevados de Na^+, no se detecta ningún efecto dañino de la hormona, sin que las bases moleculares de esta observación sean conocidas. En segundo lugar, el uso de antagonistas del MR tiene efectos beneficiosos para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca, independientemente del ligando que esté activando dicho receptor. Si bien estas observaciones tienen gran importancia, no permiten deducir si la aldosterona tiene alguna función directa sobre el sistema cardiovascular en condiciones fisiológicas. Debido a lo expuesto anteriormente sobre la especificidad (o más bien la falta de ella) del MR, y con los escasos conocimientos que tenemos sobre el funcionamiento de este receptor, es difícil explicar la forma en la que la aldosterona podría ser su ligando fisiológico, en células como los cardiomiocitos y las células endoteliales, donde no hay expresión de 11HSD2. Por tanto, es fundamental una mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el efecto de los antagonistas del MR antes de poder evaluar si la aldosterona participa o no en la activación del receptor. En otras palabras, es necesario determinar qué genes son regulados por el MR en células del sistema cardiovascular (y en general en células no epiteliales con expresión de este receptor) para poder determinar posteriormente si la aldosterona es la hormona que los modula o si por el contrario son los glucocorticoides actuando a través del MR. La identificación de estos genes permitiría a su vez comenzar a estudiar la función fisiológica del MR y en su caso de la aldosterona sobre tejidos no epiteliales.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Teresa Giráldez por sus útiles comentarios sobre el manuscrito. El trabajo del autor sobre los mecanismos de acción de la aldosterona está financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2004-04433).

Referencias

-Alvarez de la Rosa D, Canessa CM , Fyfe GK, Zhang P (2000) Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. Annu Rev Physiol 62:573-594.

-Alvarez de la Rosa D, Paunescu TG, Els WJ, Helman SI, Canessa CM (2004) Mechanisms of regulation of epithelial sodium channel by SGK1 in A6 cells. J Gen Physiol 124:395-407.

-Delcayre C, Swynghedauw B (2002) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. The role of aldosterone. J Mol Cell Cardiol 34:1577-1584.

-Farman N, Rafestin-Oblin ME (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. Am J Physiol Renal Physiol 280:F181-192.

-Funder JW (2003) Aldosterone resurgens--letter from EPHESUS. J Clin Endocrinol Metab 88:2373-2375.

-Funder JW (2005) The Nongenomic Actions of Aldosterone. Endocr Rev doi:10.1210/er.2005-0004.

-Geserick C, Meyer HA, Haendler B (2005) The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. Mol Cell Endocrinol doi:10.1016/j.mce.2005.03.007.

-Gilmour KM (2005) Mineralocorticoid receptors and hormones: fishing for answers. Endocrinology 146:44-46.

-Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE (2004a) Is Aldosterone Synthesized within the Rat brain? Am J Physiol Endocrinol Metab

-Gomez-Sanchez, EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE (2004b) Origin of aldosterone in the rat heart. Endocrinology 145:4796-4802.

-Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001) Molecular mechanisms of human hypertension. Cell 104:545-556.

-Losel R, Wehling M (2003) Nongenomic actions of steroid hormones. Nat Rev Mol Cell Biol 4:46-56.

-Pitt, B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J (1999) The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. -N Engl J Med 341:709-717. Spat A, Hunyady L (2004) Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev 84:489-539.

-Williams JS, Williams GH (2003) 50th anniversary of aldosterone. J Clin Endocrinol Metab 88:2364-2372.

Diego Álvarez de la Rosa
Unidad de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna,
38071 La Laguna, Canarias
Teléfono: +34-922-319350
Fax: +34-922-655995
Correo electrónico: diego.alvarez@ull.es

Uno de los efectos fisiológicos más importantes del óxido nítrico es la regulación de la tensión arterial y venosa. Durante años, numerosos autores habían descrito la existencia de una molécula difícilmente identificable que era capaz de difundir desde la capa de células epiteliales hasta el músculo, produciendo vasodilatación. Esta molécula fue inicialmente llamada EDRF, o factor de relajación derivado del endotelio.

EL ÓXIDO NÍTRICO EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Inmaculada Navarro-Lérida, Mónica Martínez-Moreno y José Ignacio Rodríguez-Crespo

Uno de los efectos fisiológicos más importantes del óxido nítrico es la regulación de la tensión arterial y venosa. Durante años, numerosos autores habían descrito la existencia de una molécula difícilmente identificable que era capaz de difundir desde la capa de células epiteliales hasta el músculo, produciendo vasodilatación. Esta molécula fue inicialmente llamada EDRF, o factor de relajación derivado del endotelio.

Descubrimiento del óxido nítrico en el sistema cardiovascular.

Durante la década de 1970, diversos autores observaron cómo la acetilcolina era capaz de inducir a veces vasodilatación y a veces vasoconstricción en circunstancias experimentales muy similares. La variabilidad entre experimentos parecía surgir de la habilidad experimental y del mantenimiento de la monocapa de células endoteliales durante el aislamiento del vaso. Utilizando anillos aórticos de conejo a los que se había eliminado en algunos casos la capa de células endoteliales, Furchgott y Zawadski propusieron en 1980 que el EDRF necesariamente procedía del endotelio vascular y difundía con rapidez hacia la capa de células musculares. Esta misteriosa molécula no era como el resto de las sustancias vasodilatadoras endógenas conocidas y, debido a su corta vida media, el EDRF desafiaba la caracterización bioquímica. Por ello, se determinó que la acetilcolina era capaz de inducir la relajación de arterias aisladas siempre y cuando la fina capa de células endoteliales estuviese presente. Pronto se puso de manifiesto que el número de sustancias capaces de inducir vasodilatación dependiente de endotelio incluía al ionóforo de calcio A23187, ATP y ADP, la sustancia P, bradiquinina, trombina, vasopresina, serotonina e histamina. De hecho, la observación inicial de que el ionóforo de calcio A23187 era un agente inductor de la relajación de vasos muy potente parecía sugerir que el calcio jugaba un papel fundamental en la liberación, o incluso en la síntesis de EDRF o de alguna otra molécula vasodilatadora procedente del endotelio.
En 1986, varios investigadores, de un modo independiente, propusieron que el EDRF era, en realidad, el óxido nítrico (·NO), o una sustancia que contenía tal compuesto. Los primeros experimentos en los que el ·NO procedía de soluciones que contenían nitritos en medio ácido dieron paso a ensayos en los que se utilizaron disoluciones en las que se burbujeó ·NO gaseoso, comprobándose la identidad de la molécula vasoactiva. Posteriormente Moncada y Palmer demostraron que el ·NO procede de uno de los nitrógenos químicamente equivalentes del grupo guanidinio de la L-Arg y exhibía propiedades de difusión y estabilidad semejantes a las observadas para el EDRF. Por otro lado, el grupo de Moncada también demostró que el ión superóxido (O_2^-) rápidamente inactiva el EDRF y que la superóxido dismutasa previene esta inactivación. Hoy en día se asume que el EDRF es, casi con total seguridad, el ·NO.

El Óxido Nítrico.

En el sistema cardiovascular, el óxido nítrico (·NO) es la molécula responsable no sólo del mantenimiento del tono vascular, sino también de la inhibición de la agregación plaquetaria, adhesión leucocitaria, así como de la modulación de la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno molecular. Esta molécula vasoactiva es un gas de difusión rápida, lo cual dificultó su identificación, aislamiento y caracterización molecular. La enzima responsable de la síntesis de óxido nítrico es la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), presente en las células endoteliales, tanto en grandes vasos, como en microvasos y capilares. En humanos, existen tres genes diferentes implicados en la síntesis de óxido nítrico, los cuales dan lugar a una isoforma neuronal (nNOS o NOS1), otra inducible (iNOS o NOS2) y, por último la isoforma endotelial (eNOS o NOS3). Las tres ·NO sintasas presentan un alto grado de homología de secuencia entre sí. Utilizando tres sustratos (O_2, NADPH y L-Arginina), son capaces de catalizar la formación de tres productos (·NO, $NADP^+$ y L-citrulina) para lo cual requieren de la presencia de tres cofactores (las flavinas FAD y FMN y la tetrahidrobiopterina). Desde el punto de vista mecanístico, se trata de dos reacciones consecutivas de mono-oxigenación típicas de los citocromos P450, en las que intervienen 5 electrones (Fig. 1). Una primera mono-oxidación de la L-arginina da lugar al intermediario de la reacción *N*-hidroxi-arginina, que nunca abandona el centro activo y sufre otra reacción de mono-oxigenación para dar lugar a citrulina y liberar ·NO. En este sentido, de forma análoga a lo que ocurre con los citocromos P450, las tres NOSs también poseen un residuo de cisteína desprotonado (tiolato) en la posición proximal del grupo hemo. Mientras que en los citocromos P450 los electrones que se transfieren al centro activo proceden, en general, de una flavoproteína denominada citocromo-P450 reductasa, las NOSs poseen su propio dominio reductasa formando parte del extremo C-terminal de su cadena polipeptídica.

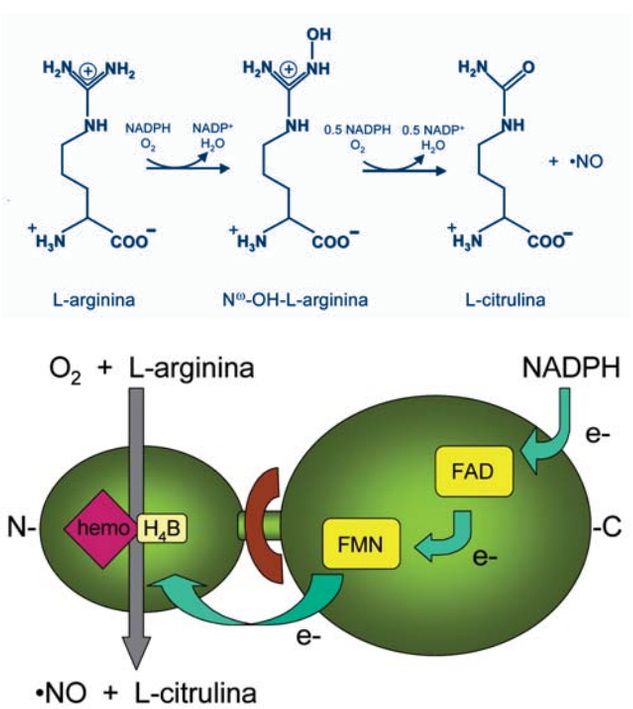


Figura 1: Síntesis de _NO a partir de L-Arg por parte de las Óxido Nítrico Sintasas y transferencia de electrones dentro de la Óxido Nítrico Sintasa.

Las NOSs son proteínas homodiméricas, a su vez compuestas por dos dominios claramente diferenciados y separados por un polipéptido que posee la secuencia consenso de reconocimiento para calmodulina (CaM), que es la molécula responsable de su activación dentro de la célula. En el caso de la nNOS y de la eNOS (isoformas constitutivas), cuando los niveles de

calcio intracelular aumentan, el calcio se une a la calmodulina, promoviendo su unión a un "dominio bisagra" que conecta los dos dominios de las NOSs (en color marrón en la Fig. 2). Por el contrario, en el caso de la iNOS, la calmodulina se une co-traduccionalmente y de forma irreversible, y no se separa de la iNOS ni siquiera en presencia de compuestos quelantes de calcio tales como el EDTA. De hecho, la regulación de la síntesis de óxido nítrico por parte de la iNOS ocurre de forma fundamentalmente transcripcional. De cualquier manera, la unión de la calmodulina a la hélice anfipática que conecta los dominios hemo-oxigenasa y reductasa activa la transferencia de electrones desde el NADPH hasta el FAD, de aquí al FMN, y por último hasta el grupo hemo (Fe-protoporfirina IX), donde tiene lugar la mono-oxigenación del sustrato. En presencia de calmodulina, en cualquiera de las tres isoformas, el átomo de hierro del grupo hemo puede aceptar electrones provenientes de las flavinas del dominio reductasa. Una vez que el átomo de hierro se encuentra en su estado reducido (ferroso, Fe^{2+}) ya puede unir O_2, procediendo a oxigenar el sustrato. Adicionalmente, las NOS son las únicas hemoproteínas que también requieren una pterina como cofactor. La síntesis de ·NO sólo tiene lugar cuando la pterina se encuentra en su estado máximo de reducción (tetrahidrobiopterina o H_4B).

La transferencia de un electrón de la H_4B al complejo oxi-ferroso que aparece durante la catálisis es responsable de la ausencia de niveles elevados de superóxido que se liberarían durante la catálisis. En general, cuando las NOSs operan a bajas concentraciones del sustrato L-arginina y de H_4B pero en presencia de CaM, la transferencia de electrones conduce a la liberación de elevados niveles de peróxido y superóxido. Todo lo dicho anteriormente se completa mediante procesos de fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina. En concreto, la eNOS se ve fosforilada, al menos, en las posiciones Ser116, Thr497, Ser617, Ser635 y Ser1179. Las diversas quinasas celulares que utilizan a la eNOS como sustrato incluyen a la PKC, AKT, CaMKII, AMPK y PKA.

Las Óxido Nítrico Sintasas.

El clonaje molecular de la eNOS fue posterior en el tiempo al de las isoformas neuronal e inducible. Utilizando decenas de cerebros de rata, Bredt y Snyder obtuvieron cantidad suficiente de la nNOS (NOS1) como para identificar la secuencia de alguno de sus péptidos proteolíticos y así poder diseñar oligonucleótidos con los que obtener partes del gen por PCR. La secuencia completa de la nNOS demostró la presencia de los dos dominios conectados por una secuencia consenso de unión a calmodulina, y remarcó por vez primera la homología de secuencia con el gen de la citocromo P450 reductasa. Este hecho, junto con la presencia de un centro activo con un resido de cisteína en forma de tiolato y el hecho de que la catálisis evolucionara a través de dos reacciones consecutivas de mono-oxigenación recalcó la semejanza con aspectos mecanísticos y estructurales típicos de los citocromos P450.
La secuencia de la iNOS (NOS2) fue obtenida por el grupo de Nathan casi de forma simultánea a Lowenstein y Snyder. Se pudo observar cómo esta isoforma no poseía los primeros 226 residuos que sí se encuentran presentes en la nNOS y que están implicados en asociación con proteínas de la región post-sináptica y con la cadena ligera de dineína.
Por último, el gen de la eNOS (NOS3) fue identificado por Lamas, Marsden y Michel en la Universidad de Harvard. Esta isoforma era de similar tamaño que la iNOS (~135 kDa) pero de menor tamaño que la nNOS (~160 kDa). Estudios posteriores demostraron que esta isoforma se ve acilada en dos residuos de cisteína de las posiciones 15 y 26 con ácido palmítico a través de un enlace tioéster.

Modulación de la actividad de la eNOS mediante su unión a caveolina-1.

Como se señaló anteriormente, la eNOS es la única isoforma de óxido nítrico sintasa que se encuentra doblemente acilada por los ácidos grasos saturados mirístico y palmítico. La miristilación de eNOS ocurre en el residuo de glicina amino terminal en una secuencia consenso que no aparece ni en nNOS ni en iNOS. La palmitoilación tiene lugar en dos cisteínas localizadas en las posiciones 15 y 26 y sirve para promover su interacción con microdominios de membrana enriquecidos en colesterol y esfingomielina. Mientras que la miristilación de la eNOS es un proceso irreversible, su palmitoilación es un proceso reversible y dinámicamente regulado: la eNOS sin palmitoilar se localiza en el citosol, mientras que la eNOS palmitoilada se transloca a caveolas. Agonistas tales como bradiquinina promueven el recambio de palmitato de la eNOS proporcionando un importante paralelismo con otras proteínas de señalización que se palmitoilan igualmente de un modo reversible, tales como las proteínas G. Por lo tanto, la despalmitoilación representa un mecanismo para la liberación de proteínas fuera de las caveolas en respuesta a la estimulación por el agonista. Estudios en los que se promueve la translocación de la eNOS a caveolas, seguidos de la medición de la producción de óxido nítrico celular, complementados con estudios en los que se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a la caveolina-1, han demostrado que la asociación de la eNOS con dicha proteína conduce a la inhibición de la síntesis de ·NO.
En células endoteliales no estimuladas, la enzima eNOS está tónicamente inhibida por su interacción con caveolina, la proteína que está formando parte esencial de las caveolas. En dicha interacción participa la región de 20 aminoácidos que posee la caveolina en su extremo C-terminal, el denominado dominio de andamiaje ("caveolin scaffolding domain"), y una secuencia presente en eNOS entre los aminoácidos 350-358 rica en aminoácidos aromáticos, del dominio reductasa. La caveolina, por tanto, actúa como inhibidor competitivo de la unión de calmodulina a eNOS, regulando de esta forma la síntesis de NO. La estimulación celular por calcio, inducida por agonistas tales como bradiquinina o la utilización de ionóforos de este catión divalente, promueve la unión de calmodulina a la eNOS y la disociación de caveolina de la enzima, lo que permite que la eNOS pase a una forma activa. El óxido nítrico formado difunde tanto hacia el torrente sanguíneo como hasta la capa de células musculares donde activa la guanilato ciclasa soluble, induciendo vasodilatación. Cuando los niveles de calcio intracelular vuelven a un estado basal, la calmodulina se disocia de la enzima y se vuelve a formar el complejo inhibitorio eNOS-caveolina. Ante una estimulación más prolongada de la célula, la eNOS se redistribuye desde la fracción particulada hacia fracciones celulares más solubles produciéndose la despalmitoilación e incrementándose la fosforilación de la enzima.
Aunque el ciclo propuesto plantea una forma de regulación de la eNOS mediante un mecanismo de palmitoilación-despalmitoilación, se desconoce aún cuales son las actividades enzimáticas que modulan estos procesos. Recientemente, se ha podido demostrar que la eNOS y la subunidad α de algunas proteínas G palmitoiladas son sustratos de una acil-tioesterasa citosólica (APT-1) con actividad de eliminación de palmítico unido covalentemente a proteínas. Por lo tanto, si la despalmitoilación de la eNOS se encuentra regulada a través de la APT-1, cabe la posibilidad de que o bien exista otra enzima desconocida implicada en su proceso de palmitoilación, o bien dicho proceso tenga lugar de forma no enzimática.
Por otro lado, recientes estudios ponen de manifiesto que el estradiol induce igualmente la translocación de la eNOS de un modo dependiente de calcio, a través de un mecanismo mediado por un receptor de membrana. De forma clásica, se pensaba que los estrógenos y otros esteroides se unían a receptores intracelulares, actuando como factores reguladores de la transcripción. Sin embargo, el descubrimiento de que la eNOS se transloca rápidamente y de un modo reversible en respuesta a estradiol es incompatible con el mecanismo de acción genómico de los estrógenos. Estos efectos del estradiol son mejor explicados mediante un mecanismo implicando receptores de la superficie celular directamente acoplados a mecanismos de señalización a través de caveolas. La identidad y regulación de los receptores de estrógenos con una función no genómica permanece sólo parcialmente conocido, aunque

estudios actuales han proporcionado datos de que los receptores clásicos de estrógenos pueden activar la eNOS. El patrón temporal de translocación de la eNOS promovido por acción de los estrógenos, se parece al producido en respuesta a bradiquinina, sugiriendo que estos dos acontecimientos pueden ser medidos por rutas de señalización similares. De cualquier manera, ambos mecanismos de translocación de la óxido nítrico sintasa endotelial son procesos estrictamente dependientes de calcio, de lo que se deduce que este catión es necesario para el proceso de activación.

Las caveolas y su composición molecular.

Aunque, clásicamente, las caveolas han venido definiéndose, desde un punto de vista morfológico, como invaginaciones de la membrana plasmática con un diámetro característico de 50-100 nm, esta descripción no es del todo adecuada. Las caveolas pueden ser invaginadas, alisadas respecto del plano de la membrana plasmática, o incluso estructuras vesiculares completamente desgajadas de la membrana plasmática. Adicionalmente, las caveolas pueden fusionarse entre sí para dar lugar a estructuras en forma de uvas e incluso túbulos, con tamaños muy superiores a los 100 nm. Son abundantes en las células endoteliales, en algunos tipos de células musculares, así como en adipocitos y células epiteliales pulmonares. Recientemente se han empezado a observar caveolas también en células de origen nervioso. Gracias al desarrollo de numerosas técnicas que permiten la purificación de las caveolas, se ha expandido sobremanera nuestro conocimiento sobre tales orgánulos, comprobándose que no sólo están implicadas en procesos de endocitosis y exocitosis, sino que también concentran una amplísima variedad de proteínas señalizadoras

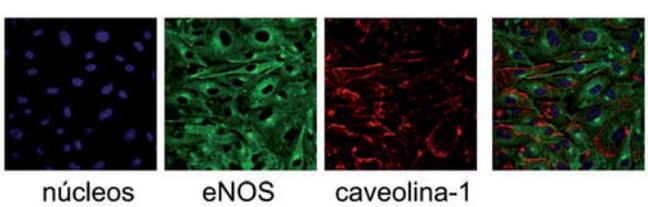


Figura 2: Inmunofluorescencia de células endoteliales donde se muestra el marcaje de la caveolina-1 y de la eNOS. Aparece una clara colocalización en áreas próximas a la membrana plasmática, y parcialmente en el Golgi.

Dos son las características fundamentales de las caveolas: por un lado su enriquecimiento en una proteína integral de membrana denominada caveolina y, por otro, su abundancia en colesterol, esfingomielina y gangliósidos, lo cual confiere a las caveolas propiedades de muy baja fluidez lipídica a temperaturas fisiológicas. Estas propiedades de fluidez tan características determinan que a estos dominios se asocien, de forma exclusiva, ciertas proteínas mientras que otras quedan excluidas. De hecho, ciertas moléculas de señalización están altamente organizadas en caveolas, donde su interacción permite el inicio de cascadas de señalización específicas. Además, muchas de estas proteínas presentan algún tipo de modificación lipídica, tales como miristilación, palmitoilación, anclajes por glicosil fosfatidil inositol (GPI) o farnesilaciones.

Referencias.

-Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991) Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351(6329):714-8.

-Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288,373-6.

-Garcia-Cardeña G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272, 25437-40.

-Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 94(11):1408-17.

-Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 61(6):866-79.

-Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(24):9265-9.

-Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Nat. Acad Sci USA* 89(14):6348-52.

-Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15):6711-5.

-Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligy JL (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ. Res.* 93(5):388-98.

-Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100(9): 2146-52.

-Palmer RM, Ashton DS, Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333, 664-6.

-Rodriguez-Crespo I, Gerber NC, Ortiz de Montellano PR (1996) Endothelial nitric-oxide synthase. Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, y role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *J Biol Chem* 271(19):11462-7.

-Sessa WC (2004) eNOS at a glance *J Cell Sci* 15;117(Pt 12):2427-9.

-Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC (2004) Update on mechanism y catalytic regulation in the NO synthases. *J Biol Chem* 279(35):36167-70.

-Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992) Cloning y characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256(5054):225-8.

Inmaculada Navarro-Lérida, Mónica Martínez-Moreno y
José Ignacio Rodríguez-Crespo.
Dept. Bioquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid.
28040, MADRID, nacho@bbm1.ucm.es

DOCENCIA

En el año 2010 se pretende alcanzar la consecución del denominado Espacio Europeo de Educación Superior. Es, por lo tanto, el momento propicio para que la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas propicie la oportuna reflexión de los contenidos formativos comunes de Fisiología.

LA FISIOLOGIA EN EL ESPACIO EUROPEO DE EDUCACION SUPERIOR

Ginés M. Salido, Catedrático de Fisiología en la Universidad de Extremadura.

El 25 de enero de 2005 comenzó "de facto" en España, mediante la publicación en BOE de los Reales Decretos 55 y 56/2005 que regulan los estudios universitarios de grado y postgrado, la cuenta atrás para la plena consecución de algunos

objetivos que habían sido enunciados en la Declaración de Bolonia de 1999. Entre ellos se encuentra la adopción de un sistema flexible de titulaciones, comprensible y comparable, que promueva oportunidades de trabajo para los estudiantes y una mayor competitividad internacional del sistema de educación europeo. La plena consecución del denominado Espacio Europeo de Educación Superior se pretende alcanzar en el año 2010, y para entonces deberemos disponer de un nuevo catálogo de titulaciones oficiales, sensiblemente más reducido que el actual, basado en dos niveles nítidamente diferenciados y que se denominan, respectivamente, Grado y Posgrado. Los títulos de Grado capacitarán a los recipiendarios para integrarse directamente en el ámbito laboral europeo con una cualificación profesional apropiada (es decir, habilitarán profesionalmente), mientras que los de Posgrado estarán destinados a la formación avanzada y conducente a la obtención del título de Master, así como a la obtención del título de Doctor, representando este último el nivel más elevado en la educación superior.

Por otro lado, las distintas subcomisiones académicas del Consejo de Coordinación Universitaria, en las que se integran los rectores de universidades públicas y privadas en función de su perfil profesional, ya han comenzado a elaborar un borrador de catálogo de titulaciones de Grado. Según declaró la Ministra de Educación y Ciencia el 25 de abril en el Senado, las cuatro subcomisiones deben evitar solapamientos entre las titulaciones y definir perfiles académicos y profesionales que se adecuen a las necesidades reales de nuestro sistema productivo y nuestra sociedad, teniendo muy presentes los estudios existentes en Europa. De momento, a expensas de futuras modificaciones, que pueden ser muchas, conocemos el nombre de las titulaciones y el número total de créditos correspondiente a cada titulación. El "crédito", equivalente ahora a unas treinta horas, es la unidad de medida del haber académico que comprende las enseñanzas teóricas y prácticas, además de otras actividades académicas dirigidas, así como las horas de estudio y de trabajo que el estudiante debe dedicar para alcanzar los objetivos de formación propios de cada una de las materias del correspondiente plan de estudios. Es más que probable que la materia Fisiología esté presente en, al menos, las siguientes titulaciones: Medicina (360 créditos totales/título), Odontología, Veterinaria y Farmacia (300 créditos), Biología (240 créditos), Enfermería, Fisioterapia, Podología, Terapia Ocupacional , Ciencias de la Actividad física y Deporte, Bioquímica y Nutrición Humana y Dietética (180 créditos).

Cada universidad, de acuerdo a las directrices generales comunes a todo título oficial y propias para cada titulación de grado que establezca en su momento el Gobierno, y en los programas de Posgrado (en los que sólo de forma excepcional el Gobierno establecerá directrices generales propias), realizará su diseño curricular concreto respecto de unas determinadas enseñanzas, es decir su Plan de estudios. Será entonces cuando, en cada universidad y para cada titulación, se concrete el peso específico de las diferentes materias (la Fisiología en nuestro caso), ya que se pretende que las universidades diversifiquen su oferta y establezcan itinerarios de libre configuración curricular. Y será entonces cuando todos los fisiólogos nos veamos en la situación (por tercera vez en la vida laboral de muchos de nosotros) de tener que ponderar en cada universidad la Fisiología, respecto de la Bioquímica, la Farmacología, la Anatomía o la Nutrición, por poner solo algunos ejemplos.

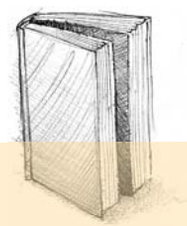
Todos sabemos como lo hemos hecho en situaciones anteriores. Es de suponer que nadie se llame a escándalo si afirmamos que, guiados por el afán de servir mejor al desarrollo de la ciencia que profesamos, impulsados por el deseo de desarrollar la pequeñas y antiguas cátedras mediante la incorporación de más y mejor formado profesorado estable hasta transformarlas en Departamentos con cierta masa crítica en el concierto internacional, y sensibilizados en buena medida por la inestable situación laboral de nuestros más jóvenes y seguramente mejor preparados colegas, en el pasado inmediato constituyó una práctica extendida defender en los claustros universitarios y en las correspondientes comisiones que "cuantas más horas teóricas y prácticas de Fisiología mucho mejor". También innecesario, por obvio, recordar que en aquellas disputas de "cuanto más mejor" participaron por igual fisiólogos y no fisiólogos. En cualquier caso el resultado final fue un conjunto de Planes de estudio en donde la unidad de medida venía determinada en horas de docencia del profesor por asignatura y grupo de estudiantes. Si miramos hacia atrás, sin ira, pero con un mínimo de espíritu crítico, no sería muy difícil concluir que ni el método, ni el desarrollo del proceso, ni, en la mayor parte de los casos, el resultado pueden calificarse de satisfactorios.

Tal vez por ello y por la experiencia acumulada, sea esta nueva oportunidad que se nos presenta la que podríamos aprovechar para definir y concretar los contenidos formativos comunes de Fisiología, es decir el conjunto de conocimientos, aptitudes y destrezas necesarios en todas las universidades para alcanzar los objetivos formativos de cada título en que se imparta la disciplina. Estos contenidos formativos comunes, o directrices generales propias del título, los fijará el Gobierno tras estudiar las propuestas elaboradas en el seno de la comunidad universitaria, contando con la participación de los sectores profesionales y colegios oficiales, así como la de los sindicatos y restantes agentes sociales implicados. Es por ello que no sería baladí que, amén de otras instancias, la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas propiciara la oportuna reflexión sobre lo que directamente nos afecta, en un momento en el que la Fisiología que se hace y enseña en España está como mínimo en la media europea (según indicadores bibliométricos ampliamente aceptados internacionalmente). Más aún cuando rara es la universidad pública que no cuenta al menos con un grupo consolidado de docentes e investigadores fisiólogos estable y de elevada cualificación; cuando se ha iniciado la incorporación de investigadores no necesariamente docentes a los departamentos de Fisiología (aunque aún sea tibia y tímida); cuando por cuestiones demográficas en los próximos 10 años el sistema universitario español disminuirá en no menos de 300.000 estudiantes; cuando, en fin, sin estar aún en el mejor de los mundos posibles, ya nadie discute que para que titulados universitarios en Medicina, Odontología, Veterinaria, Farmacia, Biología, Enfermería, etc., sean los profesionales que Europa necesita para el siglo XXI deben saber Fisiología, es decir deben saber, comprender y describir los fenómenos que se manifiestan en los seres vivos en términos físicos y químicos, cómo ocurren y cuales son las consecuencias de que ocurran.

El próximo Congreso de la SECF en Valladolid podría ser una buena oportunidad para que llegáramos a un acuerdo que permitiera llevar la voz de los fisiólogos a los lugares en donde se decidirá el papel de la Fisiología en el Espacio Europeo de Educación Superior.

Ginés M. Salido, Catedrático de Fisiología en la Universidad de Extremadura.

LIBROS



Fisiología Dinámica
Alfredo Córdova.
Editorial Masson, 2003, 781 páginas ISBN: 84-458-1270X

Esta es una repetición de la crítica de Rubén V. Rial Planas sobre el libro Fisiología Dinámica de Alfredo Córdova que se publicó en el volumen 7, número 2 en noviembre de 2004. A continuación publicamos otras reflexiones recibidas en nuestra editorial sobre el texto de Alfredo Córdova.

Para escribir un texto de Fisiología es necesario que un editor reúna una serie de personas de reconocido prestigio en los diferentes campos de la Fisiología, establezca una serie de normas editoriales y obligue a un mínimo nivel de calidad. Pero parece que algunas veces no es necesaria tanta precaución: basta con que unos cuantos amigos del editor convenzan a la editorial y se lancen a escribir un tomo de varios centenares de páginas. Cada uno elige su o sus capítulos, lee dos o tres textos generales y con esto hace una síntesis.

La estrategia descrita en el párrafo anterior parece ser la que ha seguido el editor del libro que comentamos. Basta ver la distribución de capítulos para observar que, por ejemplo, uno de los autores parece ser un especialista en temas tan heterogéneos como la hematología, el sistema circulatorio, el riñón, la endocrinología, la bioenergética, el envejecimiento y la fatiga. Otro escribe capítulos sobre la hemostasia y coagulación, el sistema respiratorio y la reproducción... Ni por un momento ponemos en duda la capacidad de estos autores; sin embargo, de entrada, la amplitud de sus conocimientos sorprende. Naturalmente, también hay honrosas excepciones, en forma de capítulos escritos por profesionales muy cualificados, pero su excelente trabajo queda oscurecido por la cantidad de "aficionados" que se han reunido como autores en la presente Fisiología Dinámica.

Empezando por el título ya aparece una paradoja: si se presenta un texto de Fisiología Dinámica cabría suponer que en algún otro sitio debe haber una Fisiología Estática, de la cual el presente texto intentaría diferenciarse. La pena es que no conozco ningún fisiólogo que haya visto alguna vez tal Fisiología Estática. O sea que, o bien el editor ha sido capaz de plasmar en su libro un dinamismo adicional al que indudablemente tiene la Fisiología, o el nombre no es más que un infortunado pleonasmo.

Pero más allá del título, los errores que se acumulan en el texto son excesivos. Por ejemplo, en el apéndice I se presenta una descripción del equilibrio Donnan totalmente errónea. Igualmente, y muy lejos del dinamismo que sugiere el nombre, un anacronismo muy corriente en los más obsoletos textos de Fisiología es el ignorar la Fisiología del sueño, a pesar de que este estado ocupa una tercera parte de la vida humana. En la Fisiología Dinámica, esta no muy honrosa tradición se sigue en gran medida, porque de las casi ochocientas páginas del libro, se dedica poco más de una a este estado. Y, lamentablemente, dentro de esta página se incluye una igualmente obsoleta revisión sobre las teorías que hace ya muchos años intentaron explicar las causas del sueño, estando hoy completamente olvidadas. En realidad, la revisión no sólo es obsoleta, sino que además está mal citada, porque se expone la teoría de la deaferenciación de Bremer y Moruzzi como si no fuera una más entre las teorías pasivas, error que se reafirma en el cuadro resumen ostentosamente firmado por el editor al final del capítulo.

En otra parte del libro, al hablar de las adaptaciones del sistema respiratorio, se explica cómo en el buceo con escafandra autónoma, el buceador recibe aire comprimido "a una presión equivalente a la presión atmosférica". Lo cual constituye un error múltiple, porque, en primer lugar, sólo a dos metros de profundidad, el esfuerzo de los músculos respiratorios nunca podría vencer la presión de 0.2 $K.cm^{-2}$ que ejerce la columna de agua sobre la caja torácica del buceador. La historia del buceo está llena de incidentes con resultados fatales como consecuencia de desequilibrios entre presiones del pulmón y del medio interno, historia que el autor del capítulo parece ignorar. Pero las cosas son más graves, porque cualquier estudiante de Fisiología debería ser capaz de describir el edema pulmonar agudo que sobrevendrá a un buceador a los pocos segundos de mantener tal desequilibrio entre la presión del medio interno y las del pulmón mantenido "a una presión equivalente a la atmosférica". Lo cual no dice mucho de los conocimientos del autor, no ya sobre la Fisiología de la respiración, sino de Fisiología Básica.

El texto acaba con dos páginas de bibliografía en las que no se alcanzan las setenta referencias. Puesto que el libro tiene 56 capítulos y cinco apéndices, parece que apenas se presenta un promedio de una referencia por capítulo. Lo cual es un indicador más de la calidad del contenido.

Lo que se ha expuesto en las líneas anteriores es la crítica de un lector que presume de tener unos conocimientos bastante limitados y solamente en unas pocas ramas de la Fisiología, una persona que, por simple humildad, está muy lejos de atreverse a hacer una crítica de todo cuanto aparece en el libro. Pero si en una lectura limitada se han encontrado algunos errores (juzgue el lector sobre lo graves que son), cabe imaginar que el texto debe ocultar algunos más. Probablemente, los errores de este tipo son inevitables cuando se recurre a autores de escasa experiencia acerca de las materias sobre las que han escrito.

Rubén V. Rial Planas.
Universidad de Las Islas Baleares.

La obra titulada "Fisiología Dinámica", editada por Masson, está dirigida por el Profesor Alfredo Córdova, Catedrático de Fisiología de la Universidad de Valladolid (Campus Universitario de Soria). En ella se desarrolla la Fisiología con una visión pedagógica de dinamismo, implicando al estudiante mediante esquemas integrados por entidades fisiológicas funcionales o reguladoras. Con estos esquemas el alumno puede obtener una visión de conjunto de los procesos fisiológicos y puede ir relacionando con continuidad y de forma clara los diferentes aspectos de la Fisiología, si bien es cierto que algunos esquemas concentran demasiada información. Como indica en el prefacio el director de la obra, el conocimiento de la Fisiología requiere en principio tener una idea o esquema lógico de la misma, y no conocerla como una entidad estanco en una visión estática y aislada, no integrante, ni integral, con la consiguiente pérdida de perspectiva. Creo que en este libro se ha conseguido este

objetivo con una exposición clara, y desde una perspectiva ágil y dinámica, con la ayuda de los esquemas. Tras el prefacio en el que se ponen de manifiesto los objetivos generales del libro, ya desde el primer capítulo nos adentramos en un estudio de la Fisiología desde un punto de vista de verdadera guía para el estudiante. El Prof. Córdova ha contado con un cualificado grupo de profesores de diversas Universidades y han conseguido elaborar un libro homogéneo, que sin duda da una visión global y dinámica de los procesos fisiológicos. Los temas son tratados de forma concreta, con una redacción cuidada, de fácil lectura y una adecuada exposición. Lástima que el apartado de las ilustraciones no haya acompañado a esta obra. En definitiva, es una obra que aporta a estudiantes, docentes, e incluso a profesionales, un aspecto moderno, útil, claro y actualizado de la Fisiología.

Javier González Gallego. Catedrático de Fisiología.
Universidad de León.

La crítica al crítico.

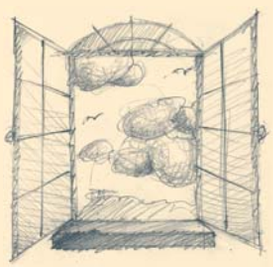
Ante la crítica al libro "Fisiología Dinámica", aparecida en el número 2 de noviembre de 2004 del Boletín de la SECF, firmada por Rubén Rial Planas, como coautor del libro que soy, desearía plantear mi disconformidad con los comentarios vertidos por dicho crítico. La primera impresión de cualquier lector desapasionado de dicha crítica es que el crítico no ha leído el libro ni en su preámbulo, pues en él se explicita claramente el objetivo del mismo, el cual no es otro que ahondar en el concepto dinámico de la Fisiología, no por obvio y elemental menos necesario de ser recalcado en la docencia de esta disciplina. Inventarse el señor Rial el concepto de la Fisiología estática demuestra a todas luces su concepto, no denostado sino inexistente, de la Fisiología en sí misma ¿Qué crédito nos merece un autor que realiza tales afirmaciones? ¿Que ha observado errores en el libro? Aunque así fuera, y de hecho admitimos que los tenga, de ellos aprendemos. No obstante, los escasos errores que ha encontrado en el libro están de algún modo fuera de todo fundamento, pues al hablar del buceo con escafandra autónoma, el crítico debería conocer que existen avances tecnológicos suficientes y adecuados que permiten soslayar ampliamente los límites fisiológicos; así lo muestran aquellos capítulos dedicados a este tema que pueden encontrarse en distintos textos de Fisiología ¿Que podríamos habernos extendido explicando esos avances tecnológicos en el capítulo? Por supuesto, pero ese no era el objetivo ni del libro ni del capítulo. Por tanto, a la luz de estas manifestaciones, se puede percibir la tendencia sofista del crítico, que elabora un discurso lógico a partir de un concepto de partida a sabiendas erróneo. Además, la crítica de que los autores del libro han utilizado una escasa bibliografía es igualmente falsa y tendenciosa, pues es obvio indicar que un único texto de Fisiología como cualquiera de los citados, con más de ochocientas o mil páginas aportará una información más amplia que en un único aspecto. De igual modo ocurre con el uso de los ejemplares anuales del Annual Review of Physiology, que podrá informar de numerosos aspectos de la Fisiología, con una excelente puesta al día de los temas. Por tanto, la división de tantos capítulos por tantas referencias es, también, otra clara forma de ejercer como sofista. Parece evidente pues que el objetivo del crítico parece ser verter un manto de oscuridad sobre la actividad científica y pedagógica de determinadas personas que intervienen en la obra, pues para él, los contenidos y su presentación en el libro parecen ser lo menos importante; si no ¿cómo se explican los párrafos tendenciosos y descalificadores que hace en la fase introductoria, antes de apuntar dos fallos del libro? En definitiva, un modelo de crítica de libros a no seguir y que desprestigia a quien la realiza.

Josep A. Tur Marí.
Universidad de las Islas Baleares.

LA VENTANA DEL FISIÓLOGO

¿PARA QUÉ SIRVE EL ENVEJECIMIENTO?

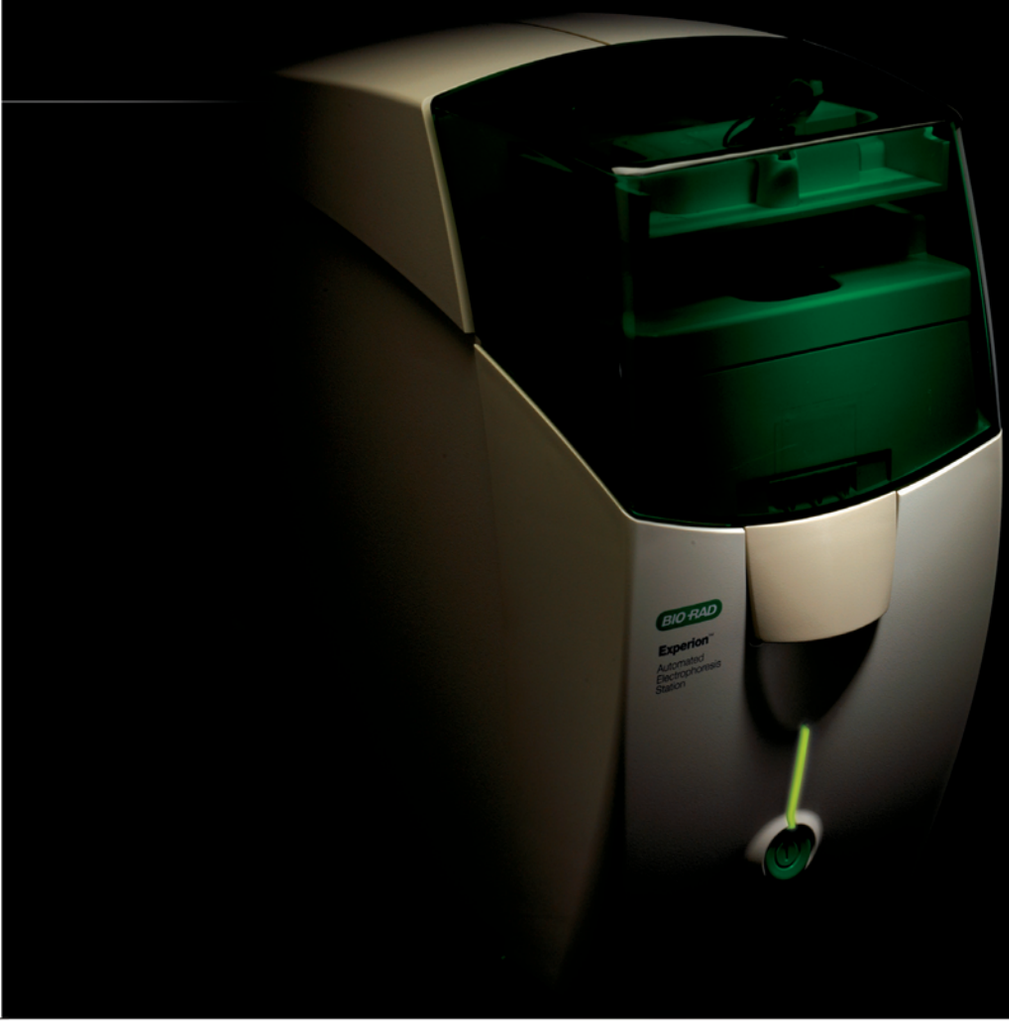
Gustavo Barja
Departamento de Fisiología Animal-II, Facultad de Ciencias Biológicas,
Universidad Complutense de Madrid



El envejecimiento es un proceso fisiológico que abarca la mayor parte de nuestra vida. O crecemos o envejecemos. ¿Para qué les sirve a los seres vivos un fenómeno que los deteriora? El punto de vista clásico argumenta que el "mantenimiento" es la causa de la longevidad. Pero, ¿a qué se debe ese mantenimiento? Se suele asumir que se debe a las defensas frente al daño y a la capacidad de reparación del mismo. Sin embargo, al menos en lo que se refiere al mecanismo de envejecimiento más conocido, el estrés oxidativo, la información disponible no apoya ese punto de vista.

La células aeróbicas generan continuamente radicales libres en sus mitocondrias y acumulan mutaciones somáticas en el ADN mitocondrial durante el envejecimiento. El organismo tiene una batería de sistemas antioxidantes. Pero las especies animales de vida larga no tienen niveles mayores de antioxidantes sino todo lo contrario, niveles más bajos. Algo similar parece ocurrir con la reparación. Recientemente se ha medido la reparación del daño oxidativo al ADN mitocondrial en animales sometidos a restricción calórica (que envejecen más despacio), y se ha encontrado una reparación menor (FASEB J. 18:595-97, 2004). Así, desde el punto de vista del estrés oxidativo, el "mantenimiento" de los animales longevos no consiste en aumentar las defensas ni la reparación, sino en generar poco daño endógeno por unidad de tiempo. Si la generación de daño es lenta no hacen falta niveles altos de defensas ni de reparación. Este resultado no es extraño si tenemos en cuenta las cuatro características del envejecimiento universalmente aceptadas por los gerontólogos: es un proceso universal, progresivo, endógeno, y deletéreo.

¿Por qué entonces tanta insistencia en las defensas y la reparación por parte de los teóricos del envejecimiento? Quizás porque asumen que la selección natural es el único mecanismo evolutivo y razonan como sigue. Un carácter que no se expresa en la naturaleza, como el envejecimiento, no puede ser objeto de selección. Además, al individuo no le "interesa" envejecer. ¿Cómo podrían entonces seleccionarse genes pro-envejecimiento? Lo que se seleccionarían serían genes pro-longevidad como los de las defensas y la reparación. Estos razonamientos tienen varias limitaciones. Por una parte, los animales longevos generan poco daño interno en lugar de aumentar las defensas y la reparación. Por otra, en las poblaciones naturales disminuye la



Experience + Innovation

Revealing the Future of Electrophoresis.

Whether you work with RNA or proteins, Bio-Rad's new automated Experion™ system will change the way you look at electrophoresis.

The Experion automated electrophoresis system is a powerful, compact, and affordable separation and analysis system that applies microfluidic technology to reinvent the way that you perform one-dimensional electrophoresis. The Experion system transforms the way you obtain your data through:

- Automated separation, detection, and analysis
- High resolution and sensitivity comparable to mini-gel results
- Fast, 30 minute batch runs of 10–12 samples
- Single-step sizing and quantitation
- Familiar data formats — electropherograms, gel views, and tables
- Minimal sample and reagent requirements

For more information, visit us on the Web at **www.bio-rad.com/ad/experion/**

Visit us on the Web at **discover.bio-rad.com**
Call toll free at 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723);
outside the US, contact your local sales office.

BIO-RAD

frecuencia de individuos al aumentar su edad, pero dicha frecuencia no es cero. Además, en el caso del hombre, que tiene comportamientos cooperativos grupales, los individuos viejos aportaban conocimiento al grupo, por lo que a los jóvenes les "interesaba" protegerlos. Aparte de la selección natural, parecen existir otros mecanismos evolutivos como la cooperación o los genes hox durante el desarrollo. Hoy sabemos que la célula eucariótica es el resultado de la fusión cooperativa de varias procariotas primitivas para dar lugar a un ser más complejo al combinar características distintas en un solo individuo. Otro gran salto evolutivo es de nuevo la cooperación entre células de los animales multicelulares como nosotros. Venimos a ser así una "colonia de colonias", lo que muestra la importancia de la cooperación en la evolución. El darwinismo nos ha llevado a enfatizar la idea de competencia, pero competencia y cooperación son dos conceptos opuestos y no es extraño que los dos actúen como fuerzas evolutivas. Además, multitud de investigaciones publicadas en los últimos años en revistas como Science, Nature o Cell nos muestran que sí existen genes pro-envejecimiento en todo tipo de seres, desde los gusanos a los mamíferos, ya que los mutantes que no los expresan envejecen más despacio, no más rápido. Un grupo importante de dichos genes participa en la señalización "insulin-like".

Por último, la única manipulación conocida que retrasa el envejecimiento, la restricción calórica, nos aporta otra reflexión. El restringido vive más y se reproduce menos. Se suele decir que tiene sentido. ¿Para qué traer hijos al mundo cuando no hay alimento en el medio natural? Pero, ¿y al revés? Cuando hay mucha comida aumentan la velocidad de envejecimiento y la intensidad reproductora. El resultado es la generación de nuevas variantes genotípicas como substrato del cambio evolutivo. Esto nos muestra que no importa que una característica sea perjudicial para el individuo si es beneficiosa para la especie.