

Cirugía y Cirujanos

Volumen **72**
Volume

Número **2**
Number




Marzo-Abril **2004**
March-April

Artículo:




El calcio, átomo detonante de la vida y
la función celular

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Academia Mexicana de Cirugía

Otras secciones de
este sitio:

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

El calcio, átomo detonante de la vida y la función celular

Dr. Armando Mansilla-Olivares*

Resumen

No obstante que durante más de tres décadas se ha señalado que los sistemas de fosforilación y defosforilación son los mecanismos que utilizan las células vivientes para regular los procesos biológicos, parece evidente que la dinámica del calcio en la célula es el fenómeno que precede y controla la activación proteica al alterar la conformación de estas moléculas mediante la introducción de grupos fosfato. El proceso se inicia cuando túbulos especializados en la superficie de la membrana permiten el flujo de este ion, el que una vez en su interior forma el complejo calcio-calmodulina, molécula determinante en la activación de distintos sistemas de proteincinasas. La célula en estas condiciones, además de alterar su polaridad, facilita la neuroconducción y la liberación de sustancias como hormonas y parahormonas, promueve los mecanismos de comunicación intra e intercelular e influye en su expresión fenotípica, al activar genes de respuesta inmediata y mediata. El calcio en su forma iónica controla mecanismos de facilitación a corto y largo plazo, interviniendo en procesos tan complejos como la integración de la memoria a través de los fenómenos de depresión homosináptica y de facilitación heterosináptica; dispara los fenómenos de autofosforilación de algunos sistemas enzimáticos, promoviendo y potenciando la actividad celular; incluso interviene en la regulación de mecanismos tan delicados como la transducción y decodificación de la señal. Las características y rango de flujo de este ion están involucrados también en la actividad de un cierto grupo de fosfatasa capaces de contrarrestar, y de esta manera regular, el fenómeno de autofosforilación. Interviene en la activación cruzada de las proteincinasas A y G, regulando la producción de óxido nítrico a nivel endotelial sistémico y dentro del sistema nervioso central. En un futuro la intervención farmacológica que se logre ejercer sobre los flujos iónicos del calcio, será determinante en la prevención y control de un sinnúmero de eventos fisiopatológicos.

Palabras clave: canales iónicos del calcio, dinámica del calcio, calcio y función celular.

Summary

Although during the last three decades phosphorylation and dephosphorylation systems have been pointed out as the mechanisms used by living cells to control biological processes, it seems that calcium dynamics is the phenomenon that precedes and controls protein activation by the introduction of phosphate groups into distinct protein structures. The process begins with activation of calcium channels that allows the influx of the ion, which once inside the cell leads to calcium-calmodulin complex, a molecule capable of triggering activation of distinct protein kinases. Thus, the cell in addition to suffering a change in polarity enhances neuroconduction and release of different substances such as hormones and para-hormones, facilitates intra- and intercellular communication, and exerts determinant influence on phenotypic expression by means of promotion of immediate and mediate response genes.

Ionic conformational calcium runs short- and long-term facilitation mechanisms, exerting its influence on control of memory through homosynaptic depression and heterosynaptic facilitation processes; triggers autophosphorylation of several enzymes leading and enhancing cellular activity and participates in signal transduction and decodification. Calcium influx rate activates certain groups of phosphatases capable of inhibiting autophosphorylation processes, only as a negative feedback mechanism. In addition, ionic calcium also participates in the "cross-activate" mechanism of protein kinases A and G, influencing to production of systemic and central nervous system nitric oxide.

On these bases, it is possible to guess that future pharmacologic interventions on calcium fluxes could be of invaluable importance in prevention and control of a number of distinct physiopathologic events.

Key words: Calcium channels, Calcium dynamics, Calcium and cellular function.

* Internista, Doctor en Neurociencia, Jefe de la Unidad de Investigación Biomolecular, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Solicitud de sobretiros:

Dr. Armando Mansilla-Olivares.
Unidad de Investigación Biomolecular, Hospital de Cardiología,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330,
Col. Doctores, 06725 México D.F.
Tel: 5627 6900, ext. 22219

Recibido para publicación: 03-12-2003.

Aceptado para publicación: 19-01-2004.

Introducción

Observaciones que se remontan a fines del siglo XIX y los albores del XX, estudios clínicos y epidemiológicos a lo largo de los últimos casi 60 años, así como detalladas investigaciones moleculares en los últimos 20 años, señalan la participación del calcio en la integración de la matriz ósea, en la contracción y relajación muscular, su influencia como inotrópico positivo, su capacidad para equilibrar y compensar el pH extra e intracelular; el papel que desempeña en la generación del potencial de membrana, la despolarización

celular y la neuroconducción. Durante la última década se ha hecho énfasis en la imprescindible función que desempeña en la integración de la compleja red de transducción de la señal desde la membrana hasta el núcleo.

Sin embargo, a pesar de toda esta abrumadora serie de evidencias tangibles que nos ha proporcionado la investigación, no se ha logrado colocar al calcio en ese punto justo que le ha dado la naturaleza.

Por un lado, el científico, al proyectar su visión al estudio de fenómenos tan específicos y detallados, ha sido incapaz de engarzar ese enorme campo de la investigación en los ámbitos subatómico, atómico y molecular, con los conceptos que proporcionan una explicación clara y contundente sobre la función integral del organismo en condiciones normales y patológicas. Por otro lado, el investigador clínico, al utilizar con una visión práctica y evidentemente aplicativa los brotes desligados e independientes del conocimiento obtenido por el científico, integra conclusiones basadas frecuentemente en la observación y no en la experimentación, estableciendo conjeturas que en algunas ocasiones sin un adecuado sustento científico se toman como hechos incontrovertibles.

El propósito fundamental de este trabajo estriba en tratar de fundamentar la importancia del papel que juega el Ca^{++} en los procesos biológicos que permiten a la célula manifestar sus funciones, haciendo hincapié en que frente a los fenómenos de fosforilación y autofosforilación se antepone el influjo iónico de Ca^{++} . De la misma forma, se exponen los más recientes conceptos a cerca de la activación celular a corto plazo, a largo plazo y a plazo prolongado, en los que el mecanismo calcio-dependiente se vuelve independiente y puede en un momento dado, a través de un fenómeno de activación cruzada, generar enormes cantidades de óxido nítrico.

Túbulos iónicos del calcio

El estudio molecular de los túbulos, canales o ductos iónicos del Ca^{++} y su participación en los mecanismos de transducción celular, sufre un gran impulso con el desarrollo de las técnicas de *patch-clamp* hace un poco más de 20 años^(1,2). Posteriormente, mediante el uso de nitrendipina, fármaco antagonista de estos túbulos, se demuestra la presencia de receptores para la dihidropiridina (DHPR) sobre la superficie de las células del músculo esquelético, lo que aunado al uso de técnicas de secuenciación de DNA y clonación permitió dar los primeros pasos en el descubrimiento de los túbulos iónicos voltaje dependientes del Ca^{++} (VDCC)⁽³⁻⁸⁾. También por medio de estas mismas técnicas fue posible descubrir una serie de proteínas capaces de regular la distribución de Ca^{++} , como las que forman parte de la estructura de su bomba y del intercambiador $\text{Ca}^{++}/\text{Na}^{+}$.

Al parecer, los túbulos iónicos del K^{+} , Na^{+} y Ca^{++} provienen de una misma familia de genes ancestrales de más de

1,400 millones de años, por lo que presentan muchas similitudes entre sí. De acuerdo con el mecanismo por el que se despierta su función, los VDCC se han subdividido en aquellos que son activados por alto voltaje (HVA) o los que son activados por bajo voltaje (LVA)⁽⁹⁾.

De la misma manera y por otro lado, los estudios iniciales en tejido nervioso demostraron la presencia de tres tipos de túbulos:

- Los L (*long-lasting*), que pertenecen a los túbulos HVA y una vez activados, su permeabilidad se prolonga hasta por 24 pS.
- Los T (*transitory*), que pertenecen a los túbulos LVA, cuya actividad perdura hasta por 8 pS.
- Los N (*neuronal*), que quedan dentro de los HVA y permanecen activos entre 1 y 3 pS⁽⁶⁾.

Si bien los túbulos T carecen de un bloqueador específico, los túbulos L son bloqueados por las DHPR y las fenilalkilaminas como el verapamil; mientras que los túbulos N son bloqueados por la ω -conotoxina (CTX) de la concha del molusco *Conus geographus*.

Utilizando éstas y otras toxinas se logró diferenciar a otros túbulos iónicos del Ca^{++} : los túbulos P, que recibieron esa denominación por predominar en las células de Purkinje; los Q, que se encuentran en los gránulos de las células cerebelosas; los R, que permanecen activos incluso después del bloqueo del resto de los túbulos iónicos. De todos ellos, los únicos clasificados como LVA son los T y los R^(9,10).

En términos generales, la estructura de los túbulos iónicos del Ca^{++} se asemeja considerablemente a la de los del Na^{+} , ya que está constituida por cuatro dominios (I, II, III y IV), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembrana (S1 a S6) y una horquilla denominada asa H5 o asa P5, que presenta dos secciones cortas: la SS1 y la SS2^(11,12). Cada segmento transmembrana está formado a su vez por subunidades de cadenas polipeptídicas: α_1 de 175 kDa, α_2 de 150 kDa, β de 52 kDa, γ de 32 kDa y δ de 25 kDa (Figura 1).

Al igual que con los túbulos iónicos del Na^{+} , el segmento S4 es el sensor de voltaje encargado de activar el influjo del ion, dado que se trata de una estructura hidrofóbica en la que cada tercer aminoácido de su cadena presenta carga positiva, confiriéndole una enorme sensibilidad a las modificaciones que sufre el campo eléctrico a lo largo de la membrana^(13,14). Al parecer, la subunidad α_1 por sí misma puede mantener la actividad del túbulo iónico voltaje dependiente, pero su asociación con el resto de cadenas polipeptídicas modifica sus propiedades, por ejemplo: la subunidad β es una tira no glucosilada con residuos hidrofóbicos, cuya unión con la subunidad α_1 afecta la apertura del túbulo^(11,15); la subunidad α_2 se une a la subunidad δ mediante puentes disulfuro en la cara externa de la membrana y regula la ampli-

tud del influjo y magnitud de la activación⁽¹⁵⁾; hasta el momento no se ha descubierto la función de la subunidad γ , que presenta cuatro segmentos transmembrana y está formada por una gran cantidad de residuos hidrofóbicos.

La cara interna de la pared de los túbulos o ductos del calcio, al igual que la de los túbulos del Na^+ y del K^+ , está recubierta por residuos de aminoácidos polares con carga eléctrica que le confiere características hidrofílicas. Por lo general estos residuos de aminoácidos son el glutámico, el aspártico, la serina y la treonina. El orificio de entrada, de aproximadamente 3 a 5 nm de diámetro, está formado por los dominios I, II, III y IV, entre los que se intercalan de manera equidistante un residuo de Ac. glutámico entre los dominios I y II, uno de lisina entre los dominios II y III y uno de alanina entre los dominios III y IV. Esa distribución tridimensional permite al orificio del túbulo presentar un alto grado de especificidad, que depende tanto de la carga eléctrica del ion como de su masa y el medio de dispersión sobre el que se desplaza.

Por otro lado, se ha demostrado que las fenilalkilaminas, como el verapamil, ejercen su función al unirse a la cara intracelular de la subunidad α_1 de la terminación del segmento transmembrana S6⁽¹⁶⁾. La función de las DHPR, en cambio, se ejerce preferentemente sobre túbulos inactivos, en una región hidrofóbica cercana a la cara externa de la membrana, justo en la unión de los segmentos S5-S6 del dominio IV, el cual contiene el asa H5^(17,18). Finalmente, las benzodiazepinas, como el diltiazem, se unen a la cara extracelular de la subunidad α_1 del dominio IV para ejercer su función⁽¹⁹⁾.

Transducción de la señal

En el caso del sistema nervioso central, por ejemplo, durante la transmisión eléctrica del impulso el influjo de Ca^{++} permite la liberación de las vesículas sinápticas y de su neurotransmisor^(20,21). De tal forma que la neurona, al presentar un incremento en la concentración intracelular de este ion, forma el complejo Ca^{++} -calmodulina (CaCaM), que por sí mismo activa a una proteincinasa CaCaM-dependiente (PK-CaCaM)^(20,22,23). Este fenómeno conduce a la fosforilación de la sinapsina-I, sustrato proteico que antes de su fosforilación muestra una gran afinidad por las vesículas sinápticas, evitando que sean liberadas del citoesqueleto; sin embargo, una vez que la sinapsina-I es modificada estructuralmente por una PK-CaCaM, pierde su afinidad por las vesículas sinápticas, que al separarse del citoesqueleto se fusionan entre sí en el espacio intersináptico, liberando al neurotransmisor (Figura 2)⁽²⁴⁻²⁷⁾. Por el contrario, durante el fenómeno de depresión homosináptica, al inactivarse los túbulos N, las vesículas sinápticas no se desprenden del citoesqueleto y, como consecuencia, el neurotransmisor no se libera. Este fenómeno puede perdurar por minutos en las conexiones sinápticas entre las neuronas sensitivas, las interneuronas y las unidades motoras, provocando cambios plásticos en las conexiones preexistentes⁽²⁸⁻³⁰⁾.

Los estímulos que llegan al sistema nervioso central lo hacen frecuentemente en brotes repetitivos de espigas depolarizantes cuyos intervalos interestímulo influyen en la función del túbulo. Cuando estos intervalos son cortos, el Ca^{++}

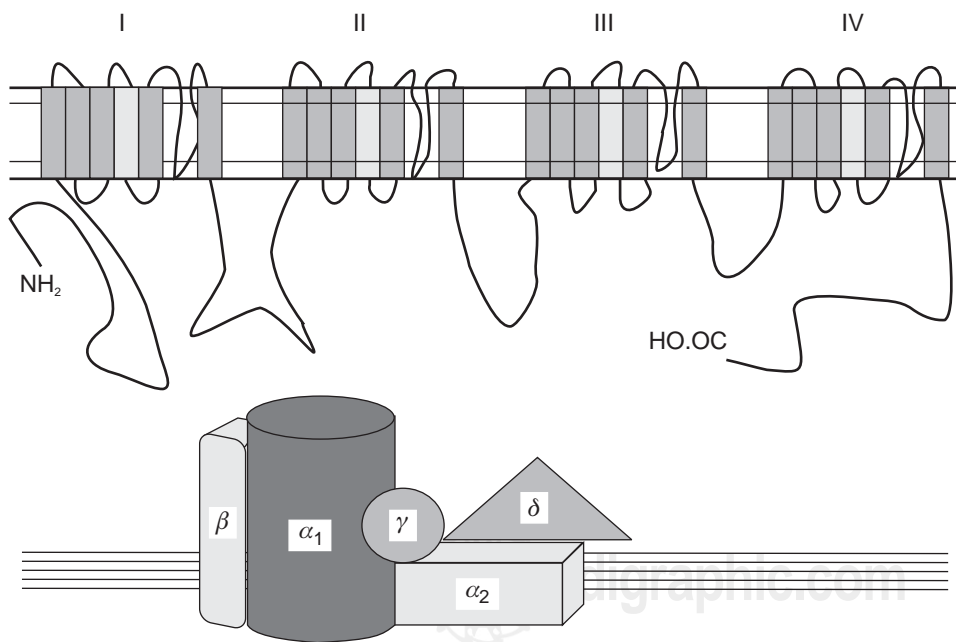


Figura 1. Los canales del Ca^{++} están constituidos por 4 dominios (I, II, III y IV) formados por 6 segmentos transmembrana y un asa P5. Cada segmento a su vez está constituido por las subunidades polipeptídicas α_1 , α_2 , β , γ y δ . El dominio S4 específicamente representa el sensor de voltaje que dispara el influjo iónico al detectar pequeñas modificaciones en la diferencia de concentración de cargas a ambos lados de la membrana.

intracelular se organiza de tal manera que provoca un proceso facilitatorio, permitiendo la liberación del neurotransmisor durante la fase de recuperación; sin embargo, cuando los intervalos interestímulo son prolongados, el Ca^{++} intracelular no se reordena, por lo que la fase de recuperación se vuelve más lenta^(31,32). Al parecer cuando los intervalos interestímulo son cortos, los bajos niveles de Ca^{++} intracelular en asociación con un decremento en su influjo, producen durante la fase de recuperación un estado de sensibilización intracelular al Ca^{++} , por lo que al comenzar el influjo de los primeros iones se produce una recuperación repentina y de gran intensidad, facilitando la liberación inmediata de grandes cantidades del neurotransmisor. Cuando los intervalos interestímulo son largos, al disminuir el pH en el espacio interneuronal se utiliza al Ca^{++} extracelular como *buffer*, disminuyendo la concentración de iones disponibles en el medio para ser capturados por el espacio intracelular, por lo que durante la fase de recuperación, e incluso después de ésta, no se libera al neurotransmisor, al permanecer las vesículas sinápticas unidas a la sinapsina-I en el citoesqueleto⁽³³⁾.

Las curvas clásicas de depresión homosináptica muestran dos diferentes componentes: el inicial, caracterizado por un rápido decremento en la respuesta, seguido de un segundo componente lento y progresivo, casi plano, pues se trata de una asíntota que permanece después de la aplicación de varios estímulos. La primera fase de la curva es el resultado del bloqueo repentino de los túbulos del Ca^{++} , lo que no permite la liberación del neurotransmisor; mientras que en la segunda parte, encontramos el punto en el que todavía podemos obtener una mínima respuesta, dado que aún quedan vesículas sinápticas disponibles en la región intersináptica, antes de que la sinapsina-I capture a las restantes⁽³⁴⁾.

En el caso de la facilitación heterosináptica, el proceso es radicalmente opuesto⁽³⁵⁻³⁷⁾. Durante este fenómeno el estímulo sensibilizante excita a un grupo de interneuronas modulatorias que se localizan entre la neurona sensitiva y la motora, permitiendo la liberación del neurotransmisor⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. En la mayoría de los casos este neurotransmisor es la serotonina o 5-OH triptamina (5-HT), que al entrar en contacto con su receptor activa a una proteína reguladora N que contiene dos fracciones: la proteica en sí misma y el grupo prostético, que en este caso es el GTP^(23,41,42). El grupo prostético que a su vez está constituido por una fracción estimuladora (N_S) y una inhibitoria (N_I), induce a la fracción N_S para activar a la adenilatociclasa que sintetizará AMPc^(41,43,44).

La cascada de eventos que desencadena la interacción de la 5-HT con su receptor específico al incrementar el influjo iónico de Ca^{++} , activa a una proteínacinasa A AMPc-dependiente (PKA-AMPc) cuya función está dirigida a la fosforilación de algunas proteínas como la que conforma la fracción S del túbulo del K^+ (⁴⁵⁻⁴⁸). La neurona, en condiciones tanto electrotónicas como durante la despolarización, permite el eflujo de K^+ a través de túbulos específicos; sin embargo, cuando la proteína S se fosforila, se cierran los túbulos voltaje-dependientes K_S , lo que bloquea su flujo. En estas circunstancias, se retarda la repolarización y se incrementa la duración del potencial de acción y, con ello, la fase durante la cual se presenta el influjo de Ca^{++} , formando un mayor número de complejos de CaCaM que desencadenará, por ende, la liberación de una proporción superior del neurotransmisor específico^(49,50). De la misma forma como la PKA-AMPc fosforila a la proteína S de los túbulos K_S , también lo hace con los túbulos A o K_A que intervienen en las fases más tempranas de la despolariza-

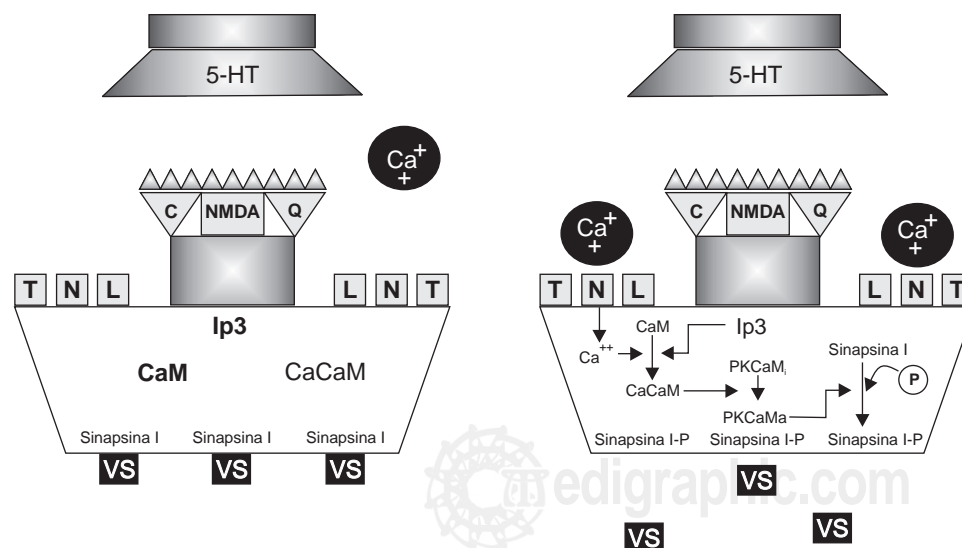


Figura 2. Cuando la sinapsina 1 es fosforilada por una PK-Ca-CaM pierde su afinidad por las vesículas sinápticas, las que al separarse del citoesqueleto y activar a las moléculas de adhesión en un medio interneuronal bajo en Ca^{++} , se fusionan liberando al neurotransmisor que activará a su vez a la neurona postsináptica.

ción neuronal, bloqueando consecuentemente el eflujo (I_{ka}) inicial de potasio⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Durante la repolarización los túbulos K_S permanecen abiertos facilitando el I_{ka} de K^+ , acelerando la repolarización; pero cuando la 5-HT promueve su fosforilación, bloquea el I_{ks} retardando la repolarización⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾. Durante la despolarización, los túbulos K_A también permanecen abiertos, dando lugar a un rápido I_{ka} de K^+ , que se detiene 10 a 100 mseg después de haberse iniciado; en consecuencia, su fosforilación prolonga la fase inicial de la despolarización y, con ello, la duración del potencial de acción^(45,51,57,58). La prolongada despolarización y el retardo en la repolarización, permiten la activación de los túbulos N, incrementando el influjo de Ca^{++} ⁽⁴⁵⁾. Por este motivo es que la interacción de la 5-HT con su receptor específico, además de prolongar la duración del potencial de acción, retarda la repolarización y activa al complejo CaCaM. Este fenómeno desencadena también la activación transitoria seguida de la inactivación de los túbulos K_S y K_A , así como la de los túbulos Ca^{++} -dependientes del K^+ (K_{Ca}), que al ser activados por este catión divalente también producen eflujo de K^+ . Como resultado de esta serie de fenómenos se incrementa la magnitud de la despolarización del potencial propagado.

Por otro lado, la fracción N_S de la proteína reguladora activa al diacilglicerol por medio de una fosfolipasa, promoviendo la función de una proteincinasa C AMPc-dependiente (PKC-AMPc), que finalmente desencadena la libera-

ción de las vesículas sinápticas y por ende del neurotransmisor⁽⁵⁹⁾. De tal manera que cuando la neurona prolonga la duración de la activación de la PKA-AMPc, de la PKC-AMPc y de otras PK CaCaM-dependientes, perpetúa la duración de su actividad⁽⁶⁰⁾. La depresión homosináptica, al igual que la facilitación heterosináptica, es un fenómeno que puede presentarse a corto o largo plazo, con duración de unos cuantos minutos u horas, o bien, puede extenderse por períodos de días o semanas, dependiendo del número y calidad de los estímulos aplicados al modelo experimental y del tipo de PK que ha sido activada⁽⁶¹⁾.

La PKA y sus holoenzimas están constituidas por una subunidad regulatoria y una catalítica que se disocian en monómeros activos en presencia de AMPc, y dado que el predominio de una u otra subunidad influye en la actividad metabólica de la neurona, es necesario que se mantengan en equilibrio^(60,62-64).

En la *Aplysia* se han descrito cinco diferentes formas de subunidades regulatorias a las que se les denomina N_1-N_5 ; cada una de ellas contiene dos dominios aminoterminales⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾:

- Uno constituido por 30 residuos de aminoácidos ricos en prolina, ácido glutámico, serina y treonina (PEST), que puede ser rápidamente degradado.
- Otro que conforma la región de bisagra y es adyacente al dominio PEST, que al contener pares de aminoácidos dibásicos es fácilmente sometido a escisión.

Figura 3a.

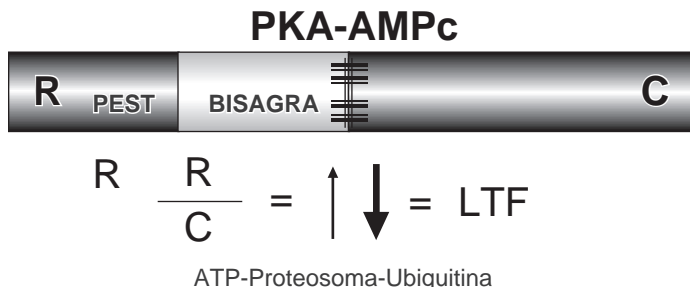
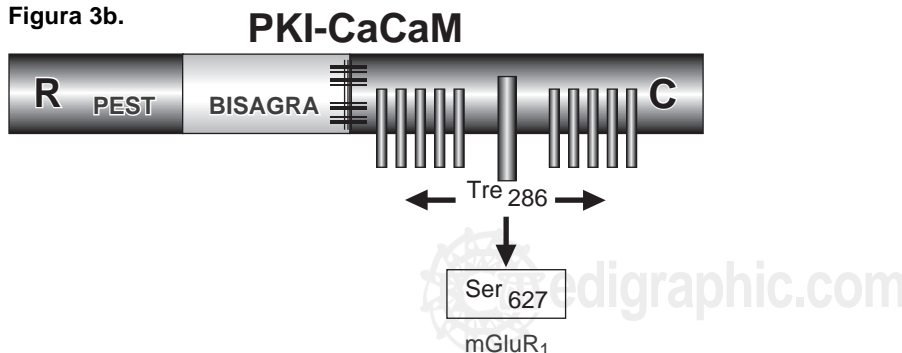


Figura 3a. Se ejemplifica a las subunidades reguladora y catalítica de la PKA-AMPc. Cuando los sitios multiubiquinados de la subunidad reguladora son hidrolizados, la subunidad catalítica promueve procesos de fosforilación proteica y la liberación del neurotransmisor en la región sináptica, desencadenando LTF. 3b. La PKII-CaCaM al ser fosforilada en el sitio Tre-286, entra en un estado de autofosforilación en el que el proceso de defosforilación conduce la refosforilación de los sitios adyacentes mediante un mecanismo Ca^{++} independiente. Durante este fenómeno, la PKII-CaCaM puede a su vez fosforilar al sitio Ser-627 de los mGluR₁, incrementando el influjo de Ca^{++} .

Figura 3b.



En un principio se pensó que el incremento en el tiempo de respuesta de la PKA ante niveles estables de AMPc podría depender de la activación de formas nuevas de subunidades regulatorias con gran afinidad por su sustrato activador, el AMPc; pero posteriormente se demostró que un decremento en la relación subunidad regulatoria: subunidad catalítica prolonga la respuesta de la PKA, incluso ante bajas concentraciones de este nucleótido cíclico^(62,63). De tal manera que cualquier decremento en la concentración de la subunidad regulatoria incrementa la fosforilación proteica de la neurona, prolongando la facilitación; mientras que el incremento de la subunidad catalítica facilita la liberación del neurotransmisor en las neuronas sensitivas.

Con base en estos hallazgos se considera que la facilitación sináptica a largo plazo, más que depender de un incremento en la síntesis de la subunidad catalítica, depende directamente de un incremento en el catabolismo de la subunidad regulatoria en la vía proteosómica de la ubiquitina⁽⁶⁷⁾. Esta proteólisis se inicia en el momento en que el AMPc, producto de la interacción de la 5-HT con su receptor específico, disocia a la holoenzima en sus monómeros activos, considerando que la concentración de la subunidad regulatoria depende fundamentalmente de la concentración de la subunidad catalítica y no de la síntesis de AMPc, ya que la subunidad regulatoria, al producir una capa protectora sobre la subunidad catalítica, enmascara la región de bisagra, particularmente susceptible a proteólisis⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ (Figura 3a).

Repercusión sobre la función nuclear

Con base en los conceptos previamente enunciados, se puede considerar que la interacción que se lleva entre la sustancia inductora y su receptor regula la actividad neuronal, muscular y celular en general, a corto y a largo plazo, dependiendo de los túbulos iónicos voltaje dependientes del K^+ que han sido activados mediante el influjo inicial de Ca^{++} a través de los VDCC. Como se señaló con anterioridad, la fosforilación de los túbulos K_S produce un incremento en la excitabilidad y en la resistencia a la entrada de corriente, y retarda además la repolarización. Los túbulos K_D , en cambio, facilitan el eflujo de K^+ cuando el estímulo despolarizante ha sido de gran intensidad, por lo que el I_k que promueven, influyen directamente en la duración del potencial de acción; de tal forma que cuando éstos son fosforilados, disminuyen el I_k y, por ende, incrementan la duración del potencial de acción, magnificando la respuesta celular al estímulo.

Ahora bien, si consideramos que la proteína S de los túbulos K_S es el sustrato específico de la PKA-AMPc, mientras que la proteína D de los túbulos K_D es el sustrato específico de la PKC-AMPc, podemos concluir que la célula responde de dos maneras diferentes^(45,51,58,68,69):

- En relación con la actividad de la PKA-AMPc, que desencadena un incremento tanto en la excitabilidad como en la resistencia a la corriente de entrada, al promover un retardo en la repolarización.

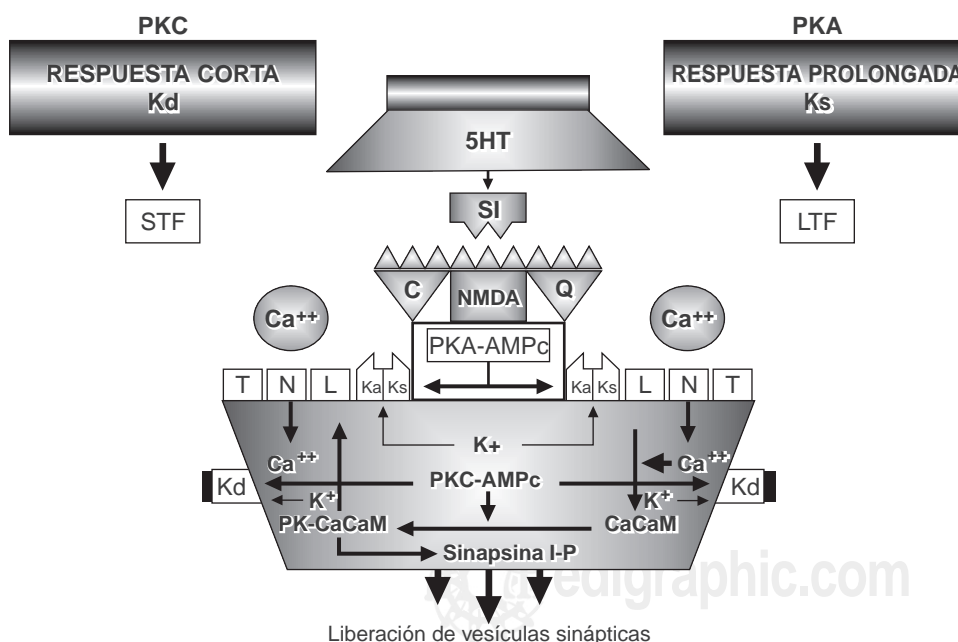


Figura 4. La PKC-AMPc al fosforilar a los canales iónicos K_D deprime el eflujo iónico de K^+ , produciendo una respuesta inmediata que prolonga la duración del potencial de acción y, con ello, la cantidad de iones de Ca^{++} que fluyen hacia el interior de la célula, amplificando la respuesta celular al estímulo y produciendo STF. La PKA-AMPc, en cambio, fosforila a los canales K_S bloqueando también el eflujo de K^+ , lo que permite en este caso producir una respuesta retardada que además de incrementar la excitabilidad y la resistencia de entrada, prolonga la repolarización y desencadena LTF.

incremento en la concentración de la proteína clathrin sobre la superficie celular⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾. Posteriormente se redistribuyen los componentes de la membrana, se expresan nuevamente sobre su superficie las moléculas de adhesión y se forman nuevos contactos celulares, remodelando con ello la estructura tisular⁽⁸⁷⁻⁸⁹⁾.

En general, las células presentan también el fenómeno de potenciación a largo plazo (LTP), el que se diferencia de la LTF en que depende de la intervención de una proteincinasa II Ca-CaM-dependiente (PKII-CaCaM)⁽⁹⁰⁻⁹²⁾. Se acepta actualmente que los receptores ácido D,L- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico dependientes (AMPA) que corresponden a los receptores glutamatérgicos (GluR) 1 al 4, los del ácido kaínico que corresponden a los GluR 5-7, los N-metil-D-aspartato dependientes (NMDAR) que incluyen a los NMDAR1 (2a, 2b, 2c y 2d) y los glutamato-metabotrópicos (mGluR) clases I (1 y 5), II (2 y 3) y III (4, 6, 7, y 8), representan todos ellos a los receptores relacionados con la LTP⁽⁹³⁻⁹⁵⁾.

Mientras que los AMPAR y los NMDAR activan distintos túbulos iónicos, los mGluR desencadenan una respuesta metabólica postsináptica que conduce a la transducción de la señal bioquímica, ya que están acoplados con el sistema de proteínas G⁽⁹³⁾. Los NMDAR y los mGluR inducen LTP mediante la activación de PK específicas; mientras que los receptores AMPA-dependientes la mantienen a través de mecanismos de autofosforilación⁽⁹⁶⁾. Este proceso principia con la estimulación de los mGluR que activan persistentemente a una PKII-CaCaM, hasta que su función se vuelve

independiente tanto del influjo de Ca^{++} como de la reactivación de los mGluR^(92,97,98).

La PKII-CaCaM contiene entre 10 y 12 subunidades catalíticas que se activan mediante el influjo iónico de Ca^{++} a través de los NMDAR, provocando un proceso de autofosforilación Ca^{++} dependiente^(99,100). Este proceso se puede prolongar mediante la refosforilación de las subunidades que se han defosforilado, a través de la acción de una fosfatasa específica durante el proceso de intercambio proteico, provocando un fenómeno de autofosforilación Ca^{++} -independiente^(99,101,102). No obstante que las subunidades de una misma holoenzima son capaces de fosforilarse entre sí, una holoenzima por sí misma es incapaz de fosforilar a las subunidades de otra holoenzima, por lo que la magnitud de la amplificación de la señal dependerá precisamente del número inicial de holoenzimas activadas durante la entrada de Ca^{++} ^(99,103,104). Al parecer, el inicio de la autofosforilación depende del sitio Tre-286 de la PKII-CaCaM, de tal manera que cuando esta Tre es defosforilada, la subunidad adyacente la refosforila de inmediato, convirtiendo al proceso en un fenómeno Ca^{++} independiente^(99,104,105). La PKII-CaCaM en estado de autofosforilación, fosforila a su vez a los GluR1 del grupo de los AMPAR en el sitio de Ser-627, incrementando aún más el influjo de Ca^{++} (Figura 3b)⁽⁹⁹⁾. Este fenómeno es regulado mediante un proceso inhibitorio provocado por las fosfatasas del grupo 1 como la fosfatasa 2A (PP1, PP2) y la 3B (PP2B o calcineurina), que ejercen su acción sobre las moléculas de fosfato que se han introducido en la Tre-286 de la PKII-CaCaM, revirtiendo el fenómeno de autofosforilación (Figura

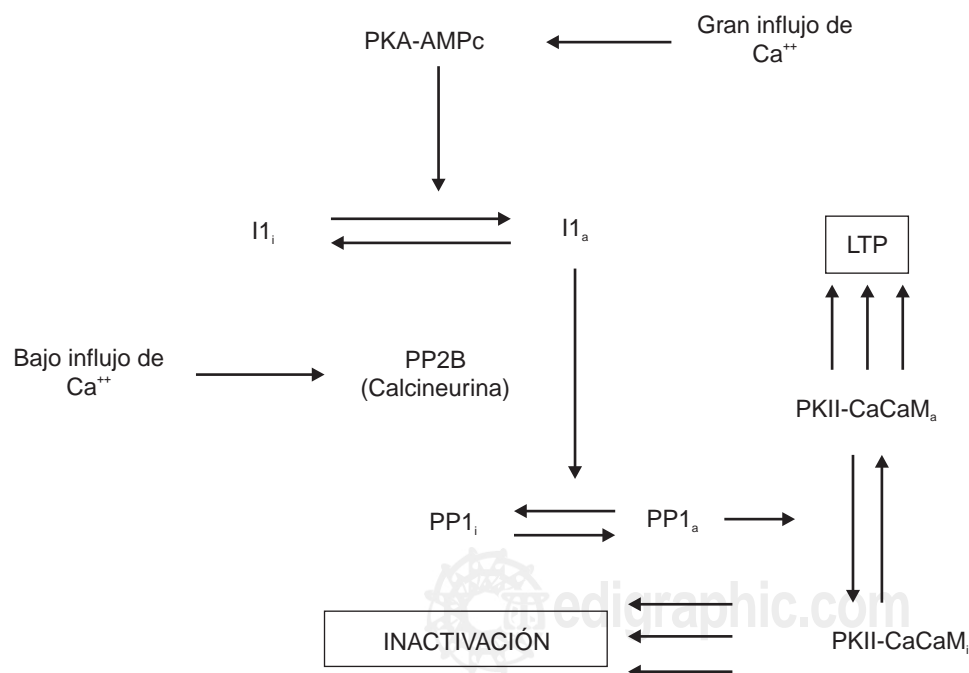


Figura 6. El fenómeno de autofosforilación es regulado mediante las corrientes de Ca^{++} . De tal forma que cuando el influjo de este ion es persistente y de gran magnitud, se activa al I1, el que al inactivar a la PP1 perpetúa la autofosforilación de la PKII-CaCaM y la duración de la LTP. Sin embargo, cuando el influjo de Ca^{++} disminuye, la PP2B inactiva al I1, permitiendo que la PP1 defosforile a la PKII-CaCaM, inactivando la LTP.

6)^(106,107). En el momento en que se inicia la LTP, una PKA-AMPC fosforila y activa a una proteína inhibidora denominada inhibidor 1 (I1), que al actuar sobre la PP1 facilita el proceso de autofosforilación y, como resultado, prolonga también la función de la PKII-CaCaM⁽¹⁰⁸⁾.

Fenómeno de convergencia-divergencia

Más que como un poderoso vasodilatador, se ha postulado al óxido nítrico como un neurotransmisor capaz de intervenir en la generación y regulación de los mecanismos de LTP entre la membrana postsináptica y la presináptica⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾. Se produce durante la conversión de arginina en citrulina mediante la intervención de la óxido-nítrico sintasa (NOS), cuya actividad, al parecer, depende tanto de una PKC como de una PKII CaCaM-dependientes, que fosforilan diferentes sitios de serina a lo largo de su estructura^(112,113). Existen dos isoformas de la NOS^(113,114):

- CaCaM-dependiente, que predomina en las células del sistema nervioso central, los vasos sanguíneos y las plaquetas.
- CaCaM-independiente, que es inducible por citocinas y se encuentra fundamentalmente en macrófagos y células endoteliales.

De hecho, ambas enzimas tienen sitios de reconocimiento para los flavinucleótidos, la PKA-AMPC, la PKC-AMPC y para la PKII-CaCaM; además, se ha demostrado que su actividad se incrementa mediante la presencia de tetrahydrobipterina^(115,116).

La síntesis del óxido nítrico depende de los requerimientos metabólicos de cada célula, pero una vez sintetizado difunde rápidamente desde la neurona postsináptica hasta alcanzar la membrana presináptica, en donde interactúa con el núcleo de hierro de la enzima encargada de la síntesis de GMPc^(114,116). Interactúa también con los núcleos de sulfato ferroso de otros sistemas enzimáticos que intervienen en el transporte de electrones en la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial, así como en el ciclo del ácido cítrico y de las enzimas que intervienen en la síntesis de DNA^(112,114). Esta interacción altera las características de la estructura tridimensional del núcleo prostético de la enzima, promoviendo la síntesis de GMPc, que activa a su vez a una PK-GMPc, la cual al fosforilar a un sustrato específico de membrana desencadena la liberación de Ac. glutámico en la neurona presináptica, promoviendo mecanismos de LTP⁽¹¹⁷⁾. Al parecer, no obstante que la LTP es un evento postsináptico, su mantenimiento requiere de la actividad presináptica mediada por GMPc y por una PKG-GMPc, que son precisamente el blanco de acción de los neurotransmisores inversos como el óxido nítrico⁽¹¹⁸⁾.

Curiosamente, se ha demostrado que tanto los mecanismos de señalización de la PKG-GMPc como los de la PKA-

AMPC se traslapan entre sí; de hecho, estos dos sistemas enzimáticos comparten algunos sustratos similares, a grado tal que el AMPC, además de activar a una PKA-AMPC, puede también activar de manera cruzada a una PKG-GMPc; de la misma manera, el GMPc puede también activar en forma cruzada a una PKA-AMPC, desencadenando un fenómeno de convergencia:divergencia en los procesos de señalización del GMPc^(119,120).

Se han descrito dos formas de PKG-GMPc⁽¹²¹⁻¹²³⁾: tipo I que se puede encontrar a su vez en dos isoformas, la α y la β (PKG α o β); y el tipo II. Ambos grupos están presentes dentro del sistema nervioso central y son capaces de iniciar procesos de autofosforilación independientemente de la concentración del sustrato, promoviendo^(118,124-126) los siguientes procesos:

- Activación de los túbulos del K⁺.
- Incremento en la frecuencia de descarga por cada interacción neurotransmisor:receptor.
- Decodificación de los mensajes transmitidos por los neurotransmisores retrógrados.
- Regulación de los flujos de Ca⁺⁺.

De hecho, se ha demostrado que la inducción y sobreexpresión de la PKGI no sólo previene el incremento en la concentración del Ca⁺⁺ intracelular, sino que la disminuye como resultado de la activación de los fosfoinosítoles que permiten el almacenamiento de este ion, o bien, como consecuencia de la activación de su eflujo^(127,128). Cuando la PKGI α entra en estado de autofosforilación, incrementa la disociación del GMPc de sus sitios de unión de alta afinidad con la PKGI α , permitiendo que el AMPC pase a ocupar su lugar, fenómeno que desencadena el proceso de activación cruzada o de convergencia:divergencia⁽¹²⁹⁾.

En comparación con la PKGI α , la PKGI β y la PGII necesitan de al menos nueve veces mayor concentración de GMPc para ser activadas⁽¹³⁰⁾. Una vez desencadenada su función, una fosfodiesterasa dentro de la neurona se encarga de modular la transmisión de la señal que promueve la PKG, catabolizando a ambos nucleótidos cíclicos⁽¹³¹⁾.

Tanto la PKA-AMPC como la PKG-GMPc activan a la fosfodiesterasa tipo V, cuyo sustrato específico es precisamente el GMPc. La NOS es también fosforilada por la PKA y la PKG, pero su velocidad de reacción enzimática disminuye con el tiempo mediante un mecanismo de retroalimentación negativa; en cambio, la CaM desencadena la defosforilación de la NOS, promoviendo posteriormente su reactivación⁽¹³²⁻¹³⁴⁾.

Conclusiones

El calcio es un átomo que resulta verdaderamente contrastante. No sólo se trata de una estructura que ejerce funciones

tan o más importantes que las que desarrollan enormes y diversos complejos moleculares, tal y como sucede con las proteínas que intervienen en la transducción de la señal; por su propia condición de átomo no es susceptible de ser metabolizado, en contraste con estructuras como las proteínas, lípidos y carbohidratos, que sufren la acción de sistemas enzimáticos que los transforman, a veces, en elementos más complejos y, en otras ocasiones, en simples productos de degradación.

El calcio, en cambio, sólo queda envuelto dentro de una dinámica bioquímica en su forma iónica o no iónica, que repercute e influye poderosamente en la función celular, tisular, orgánica y sistémica. No obstante que es un átomo indispensable para la vida, los trastornos en su influjo pueden desencadenar la muerte.

En 1979, Krebs señaló que los sistemas celulares de fosforilación y defosforilación son los mecanismos que utilizan las células vivientes para regular los procesos biológicos; de tal forma que la fosforilación produce la activación o inactivación de distintos sistemas enzimáticos regulando la permeabilidad de membrana a los iones, mientras que la defosforilación de los mismos sitios representa el mecanismo por el cual la célula regresa a su estado de reposo⁽¹³⁵⁾.

A pesar de la importancia de esta profunda observación, parecería que mucho más allá de los procesos de fosforilación y autofosforilación, se encuentran los flujos iónicos de calcio, cuya presencia es determinante en la activación o inactivación de diversos sistemas enzimáticos que involucran incluso los fenómenos de fosforilación y autofosforilación, así como en los procesos de transducción de la señal, decodificación y activación de distintos genes, procesos de neurotransmisión de naturaleza sensitiva y motora, integración de fenómenos tan complejos como los de recepción y percepción de estímulos conscientes e inconscientes, liberación de hormonas y parahormonas, contracción y relajación muscular y celular, migración y transmigración celular, activación del sistema inmune, interacción con moléculas de adhesión, mecanismos de remodelación tisular, etcétera.

Es precisamente por esto y por muchos otros conceptos, que resultaría imposible abordar en unos cuantos párrafos el porqué consideramos al calcio como el átomo detonante de los procesos biológicos. Cuando desde un punto de vista atómico y molecular logremos por lo menos influir en su dinámica dentro del organismo, la ciencia habrá dado un paso abismal que quedará colocado aún más allá de la influencia que pudiera ejercer, en la prevención y control de las enfermedades, el mismo dominio de la genética.

Referencias

1. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane-patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.
2. Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 1984;46:455-472.
3. Tanaka H, Shigenobu K. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:1305-1313.
4. Hui A, Ellinor PT, Krizanova O, Wang J-J, Diebold RJ, Schwartz A. Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the α_1 subunit of the voltage dependent calcium channel. *Neuron* 1991;7:35-44.
5. Koch WJ, Hui A, Shull GE, Ellinor P, Schwartz A. Characterization of cDNA clones encoding two putative isoforms of the α_1 subunit of the dihydropyridine-sensitive voltage-dependent calcium channel isolated from rat brain and rat aorta. *FEBS Lett* 1989;250:386-388.
6. Koch WJ, Ellinor PT, Schwartz A. cDNA cloning of a dihydropyridine-sensitive calcium channel from rat aorta. Evidence for the existence of alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1990;265:17786-17791.
7. Ma YS, Kobrinsky E, Marks A. Cloning and expression of a novel truncated calcium channel form non-excitabile cells. *J Biol Chem* 1995;270:483-493.
8. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Tekeshima H, Narumya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989;340:230-233.
9. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* 1995;64:493-531.
10. Marks RA. Plasmamembrane calcium channels. In: Marks RA, Taubman BM, editors. *Molecular biology of cardiovascular disease*. New York: Marcel Dekker;1997.pp.237-249.
11. Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM. Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* 1991;7:45-57.
12. Feron O, Octave JN, Christen MO, Godfrain T. Quantification of two splicing events in the L-type calcium channel alpha-1 subunit of intestinal smooth muscle and other tissues. *Eur J Biochem* 1994;222:195-202.
13. Pérez-Reyes E, Schneider T. Molecular biology of calcium channels. *Kidney Int* 1995;48:1111-1124.
14. Soldatov NM. Genomic structure of human L-type Ca^{2+} channel. *Genomics* 1994;22:77-87.
15. Pérez-Reyes E, Wei XY, Castellano A, Brinbaumer L. Molecular diversity of L-type calcium channels. Evidence for alternative splicing of the transcripts of three non-allelic genes. *J Biol Chem* 1990;265:20430-20436.
16. Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999;42:339-360.
17. Campbell KP, Leung AT, Sharp AH. The biochemistry and molecular biology of the dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Trends Neurosci* 1988;11:425-430.
18. MacKinnon R. Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* 1995;14:889-892.
19. Zuhlke R, Reuter H. Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels depends on multiple cytoplasmic aminoacid sequences of the α_{1c} subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3287-3294.
20. Klein M, Shapiro E, Kandel ER. Synaptic plasticity and the modulation of the Ca^{2+} current. *J Exp Biol* 1980;89:117-157.
21. Swandulla D, Hans M, Zipser K, Augustine GJ. Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: fast and slow calcium signaling in nerve terminals. *Neuron* 1991;7:915-926.
22. Llinás R, Gruner JA, Sugimori M, McGuinness TL, Greengard P. Regulation by synapsin I and Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase II of transmitter release in squid giant synapse. *J Physiol (Lond)* 1991;436:257-282.

23. Mansilla AO, Argüero RS, Rico FGM, Alba CC. Cellular receptors, acceptors and clinical implications. *Arch Med Res* 1993;24:127-137.
24. Almers W, Tse FW. Transmitter release from synapses: Does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 1990;4:813-818.
25. Bähler M, Benfenati F, Valtorta F, Greengard P. The synapsins and the regulation of synaptic function. *Bio Essays* 1990;12:259-263.
26. Llinás R, McGuinness TL, Leonard CS, Sugimori M, Greengard P. Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:3035-3039.
27. Südhof TC, Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 1991;6:665-677.
28. Engel JE, Wu CF. Altered habituation of an identified escape circuit in *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci* 1996;16:3486-3499.
29. Buonomano DV, Byrne JH. Long-term synaptic changes produced by a cellular analog of classical conditioning in *Aplysia*. *Science* 1990;249:420-423.
30. Edmonds B, Klein M, Dale N, Kandel ER. Contributions of two types of calcium channels to synaptic transmission and plasticity. *Science* 1990;250:1142-1147.
31. Byrne JH. Analysis of synaptic depression contributing to habituation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* 1982;48:431-438.
32. Gingrich KJ, Byrne JH. Simulation of synaptic depression, posttetanic potentiation, and presynaptic facilitation of synaptic potentials from sensory neurons mediating gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *J Neurophysiol* 1985;53:652-669.
33. Mansilla OA, Barajas MH, Argüero S. Theoretical aspects of the neurobiological integration of memory. *Med Hypotheses* 2000;54(1):51-58.
34. Rankin CH, Broster BS. Factors affecting habituation and recovery from habituation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav Neurosci* 1992;106:239-249.
35. Abrams TW. Activity-dependent presynaptic facilitation: an associative mechanism in *Aplysia*. *Cell Mol Neurobiol* 1985;5:123-145.
36. Frost WN, Clark GA, Kandel ER. Parallel processing of short-term memory for sensitization in *Aplysia*. *J Neurobiol* 1988;19:297-334.
37. Hawkins RD, Castellucci VF, Kandel ER. Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. I. Identification and characterization. *J Neurophysiol* 1981;45:304-314.
38. Hawkins RD, Castellucci VF, Kandel ER. Interneurons involved in mediation and modulation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. II. Identified neurons produce heterosynaptic facilitation contributing to behavioral sensitization. *J Neurophysiol* 1981;45:315-326.
39. Hammer M, Cleary LJ, Byrne JH. Serotonin acts in the synaptic region of sensory neurons in *Aplysia* to enhance transmitter release. *Neurosci Lett* 1989;104:235-240.
40. Goh Y, Alkon DL. Sensory, interneuronal, and motor interactions within Hermissenda visual pathway. *J Neurophysiol* 1984;52:156-169.
41. Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031:163-224.
42. Schütz W, Freissmuth M. Reverse intrinsic activity of antagonists on G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:376-380.
43. Ashkenazi A, Peralta EG, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ. Functionally distinct G proteins selectively couple different receptors to PI hydrolysis in the same cell. *Cell* 1989;56:487-493.
44. Chou JC, Lee EH. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. *Neuroscience* 1995;64:5-15.
45. Goldsmith BA, Abrams TW. cAMP modulates multiple K⁺ currents, increasing spike duration and excitability in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11481-11485.
46. Klein M, Camardo J, Kandel ER. Serotonin modulates a specific potassium current in the sensory neurons that show presynaptic facilitation in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5713-5717.
47. Neary JT, Alkon DL. Protein phosphorylation/dephosphorylation and the transient, voltage-dependent potassium conductance in *Hermissenda crassicornis*. *J Biol Chem* 1983;258:8979-8983.
48. Walsh JP, Byrne JH. Forskolin mimics and blocks a serotonin-sensitive decreased K⁺ conductance in tail sensory neurons of *Aplysia*. *Neurosci Lett* 1984;52:7-11.
49. Alkon DL. Calcium-mediated reduction of ionic currents: a biophysical memory trace. *Science* 1984;226:1037-1045.
50. Hawkins RD, Abrams TW, Carew TJ, Kandel ER. A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. *Science* 1983;219:400-405.
51. Hochner B, Kandel ER. Modulation of a transient K⁺ current in the pleural sensory neurons of *Aplysia* by serotonin and cAMP: implications for spike broadening. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11476-11480.
52. Braha O, Dale N, Hochner B, Klein M, Abrams TW, Kandel ER. Second messengers involved in the two processes of presynaptic facilitation that contribute to sensitization and dishabituation in *Aplysia* sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2040-2044.
53. Shuster MJ, Camardo JS, Siegelbaum SA, Kandel ER. Cyclic AMP-dependent protein kinase closes the serotonin-sensitive K⁺ channels of *Aplysia* sensory neurons in cell-free membrane patches. *Nature* 1985;313:392-395.
54. Baxter DA, Byrne JH. Serotonergic modulation of two potassium currents in the pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 1989;62:665-679.
55. Hochner B, Klein M, Schacher S, Kandel ER. Action-potential duration and the modulation of transmitter release from the sensory neurons of *Aplysia* in presynaptic facilitation and behavioral sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8410-8414.
56. Pollock JD, Bernier L, Camardo JS. Serotonin and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate modulate the potassium current in tail sensory neurons in the pleural ganglion of *Aplysia*. *J Neurosci* 1985;5:1862-1871.
57. Smith CUM. Voltage-gated-channels. In: Smith CUM, editor. Elements of molecular neurobiology. UK: 1990. pp.229-248.
58. Baxter DA, Byrne JH. Differential effects of cAMP and serotonin on membrane current, action-potential duration, and excitability in somata of pleural sensory neurons of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 1990;64:978-990.
59. Ghirardi M, Braha O, Hochner B, Montarolo PG, Kandel ER, Dale N. Roles of PKA and PKC in facilitation of evoked and spontaneous transmitter release at depressed and nondepressed synapses in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron* 1992;9:479-489.
60. Greenberg SM, Castellucci VF, Bayley H, Schwartz JH. A molecular mechanism for long-term sensitization in *Aplysia*. *Nature* 1987;329:62-65.
61. Wright WG, McCance EF, Carew TJ. Developmental emergence of long-term memory for sensitization in *Aplysia*. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65:261-268.
62. Eppler CM, Bayley H, Greenberg SM, Schwartz JH. Structural studies on a family of cAMP-binding proteins in the nervous system of *Aplysia*. *J Cell Biol* 1986;102:320-331.
63. Palazzolo M, Katz F, Kennedy TE, Schwartz JH. Multiple cAMP-binding proteins in *Aplysia* tissues. *J Neurobiol* 1989;20:746-761.
64. Bergold PJ, Beushausen SA, Sacktor TC, Cheley S, Bayley H, Schwartz JH. A regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase down-regulated in *Aplysia* sensory neurons during long-term sensitization. *Neuron* 1992;8:387-397.
65. Hegde AN, Goldberg AL, Schwartz JH. Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7436-7440.
66. Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* 1990;59:971-1005.
67. Rechsteiner M. Natural substrates of the ubiquitin proteolytic pathway. *Cell* 1991;66:615-618.
68. Mercer AR, Emptage NJ, Carew TJ. Pharmacological dissociation of modulatory effects of serotonin in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 1991;254:1811-1813.

69. Sugita S, Goldsmith JR, Baxter DA, Byrne JH. Involvement of protein kinase C in serotonin-induced spike broadening and synaptic facilitation in sensorimotor connections of *Aplysia*. *J Neurophysiol* 1992;68:643-651.
70. Soderling TR. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory. *Mol Cell Biochem* 1993;127/128:93-101.
71. Goda Y. Memory mechanisms. A common cascade for long-term memory. *Curr Biol* 1995;5:136-138.
72. Bacskaï BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science* 1993;260:222-226.
73. Greenspan RJ. Flies, genes, learning, and memory. *Neuron* 1995;15:747-750.
74. Weber W, Hilz H. cAMP-dependent protein kinases I and II: divergent turnover of subunits. *Biochemistry* 1986;25:5661-5667.
75. Klann E, Chen SJ, Sweatt JD. Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8337-8341.
76. Bailey CH, Bartsch D, Kandel ER. Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:13445-13452.
77. Abel T, Martin KC, Bartsch D, Kandel ER. Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 1998;279:338-341.
78. Dash PK, Hochner B, Kandel ER. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature (Lond)* 1990;345:718-721.
79. Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM. Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4820-4824.
80. Metz R, Ziff E. cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev* 1991;5:1754-1766.
81. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998;21:127-148.
82. Hershko A, Ganoth D, Sudakin V, Dahan A, Cohen LH, Luca FC, Ruderman JV, Eytan E. Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J Biol Chem* 1994;269:4940-4946.
83. Hegde AN, Inokuchi K, Pei W, Casadio A, Ghirardi M, Chain DG, Martin KC, Kandel ER, Schwartz JH. Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 1997;89:115-126.
84. Bailey CH, Chen M. Time course of structural changes at identified sensory neuron synapses during long-term sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 1989;9:1774-1780.
85. Rose SPR. Cell-adhesion molecules, glucocorticoids and long-term-memory formation. *Trends Neurosci* 1995;18:502-506.
86. Doherty P, Cohen J, Walsh FS. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 1990;5:209-219.
87. Hu Y, Barzilai A, Chen M, Bailey CH, Kandel ER. 5-HT and cAMP induce the formation of coated pits and vesicles and increase the expression of clathrin light chain in sensory neurons of *Aplysia*. *Neuron* 1993;10:921-929.
88. Bailey CH, Kandel ER. Structural changes underlying long-term memory storage in *Aplysia*: a molecular perspective. *Semin Neurosci* 1994;6:35-44.
89. Rose SPR. Glycoproteins and memory formation. *Behav Brain Res* 1995;66:73-78.
90. Saitoh T, Schwartz JH. Phosphorylation-dependent subcellular translocation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase produces an autonomous enzyme in *Aplysia* neurons. *J Cell Biol* 1985;100:835-842.
91. Malinow R, Madison DV, Tsien RW. Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 1988;335:820-824.
92. Pasinelli P, Ramakers GMJ, Urban IJA, Hens JHH, Oestreicher AB, de Graan PNE, Gispen WH. Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behav Brain Res* 1995;66:53-59.
93. Riedel G, Wetzel W, Reymann KG. Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatr* 1996;20:761-788.
94. Tiunova A, Anokhin K, Rose SP, Mileusnic R. Involvement of glutamate receptors, protein kinases, and protein synthesis in memory for visual discrimination in the young chick. *Neurobiol Learn Mem* 1996;65:233-243.
95. Richter-Levin G, Canevari L, Bliss TVP. Long-term potentiation and glutamate release in the dentate gyrus: links to spatial learning. *Behav Brain Res* 1995;66:37-40.
96. Lei S, Jackson FM, Jia Z, Roder J, Bai D, Orser AB, MacDonald FJ. Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. *Nat Neurosci* 2000;3:559-565.
97. Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature* 1993;363:347-350.
98. Miller SG, Kennedy MB. Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. *Cell* 1986;44:861-870.
99. Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci* 1994;17:406-412.
100. Miller SG, Patton BL, and Kennedy MB. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺-independent activity. *Neuron* 1988;1:593-604.
101. Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E. Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8342-8346.
102. Fagnou DD, Tucek JM. The biochemistry of learning and memory. *Mol Cell Biochem* 1995;149-150:279-286.
103. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-39.
104. Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 2002;364:593-611.
105. Hanson PI, Schulman H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annu Rev Biochem* 1992;61:559-601.
106. Rickard NS, Ng KT. Blockade of metabotropic glutamate receptors prevents long-term memory consolidation. *Brain Res Bull* 1995;36:355-359.
107. Riedel, G. If phosphatases go up, memory goes down. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:549-553.
108. Bortolotto ZA, Bashir ZI, Davies CH, Collingridge GL. A molecular switch activated by metabotropic glutamate receptors regulates induction of long-term potentiation. *Nature* 1994;368:740-743.
109. Thompson RF. The neural basis of basic associative learning of discrete behavioral responses. *Trends Neurosci* 1988;11:152-155.
110. Malenka RC. Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 1991;6:53-60.
111. Huang YY, Colino A, Selig DK, Malenka RC. The influence of prior synaptic activity on the induction of long-term potentiation. *Science* 1992;255:730-733.
112. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 1992;8:3-11.
113. Clark KA, Randall AD, Bortolotto ZA, Bashir ZI, Collingridge GL. Mechanisms involved in hippocampal LTP: implications for retrograde messengers. *Semin Neurosci* 1993;5:189-195.

114. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-135.
115. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-8711.
116. Marletta MA. Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biol Sci* 1989;14:488-492.
117. Carew TJ. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron* 1996;16:5-8.
118. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3,5-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 1995;376:74-80.
119. Jiang H, Shabb JB, Corbin JD. Cross-activation: overriding cAMP/cGMP selectivities of protein kinases in tissues. *Biochem Cell Biol* 1992;70:1283-1289.
120. Wang X, Robinson PJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem* 1997;68:443-456.
121. Hofmann F, Dostmann W, Keilbach A, Landgraf W, Ruth P. Structure and physiological role of cGMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1992;1135:51-60.
122. Butt E, Geiger J, Jarchau T, Lohmann SM, Walter U. The cGMP-dependent protein kinase-gene, protein, and function. *Neurochem Res* 1993;18:27-42.
123. Francis SH, Corbin JD. Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP-dependent protein kinase. *Adv Pharmacol* 1994;26:115-170.
124. Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted-amyloid-precursor protein. *Nature* 1996;379:74-78.
125. Pineda J, Kogan JH, Aghajanian GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosci* 1996;16:1389.
126. Meriney SD, Gray DB, Pilar GR. Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 1994;369:336-339.
127. Méry PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1197-1201.
128. Ruth P, Wang GX, Boekhoff I, May B, Pfeifer A, Penner R, Korth M, Breer H, Hofmann F. Transfected cGMP-dependent protein kinase suppresses calcium transients by inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2623-2627.
129. Landgraf W, Hullin R, Göbel C, Hofmann F. Phosphorylation of cGMP-dependent protein kinase increases the affinity for cyclic AMP. *Eur J Biochem* 1986;154:113-117.
130. Gamm DM, Francis SH, Angelotti TP, Corbin JD, Uhler MD. The type II isoform of cGMP-dependent protein kinase is dimeric and possesses regulatory and catalytic properties distinct from the type I isoforms. *J Biol Chem* 1995;270:27380-27388.
131. Beltman J, Sonnenburg WK, Beavo JA. The role of protein phosphorylation in the regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Cell Biochem* 1993;127:239-253.
132. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9808-9812.
133. Bredt DS, Ferris CD, Snyder SH. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 1992;267:10976-10981.
134. Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH. Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology* 1994;33:1245-1251.
135. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1979;48:923.