

*Belisario E. Fernández, Marcelo R. Choi,
Martín Rodríguez Fermepin*

Palabras clave

Segundos mensajeros, AMPc, GMPc, adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, proteína quinasa, fosfodiesterasa.

Abreviaturas utilizadas

AC: adenilato ciclasa
ACTH: hormona adenocorticotrofina
AMPc: adenosina monofosfato cíclico.
ANP: péptidos natriurético tipo A
ATP: adenosina trifosfato
BNP: péptidos natriurético tipo B
CNP: péptidos natriurético tipo C
FDEs: fosfodiesterasas
GC: guanilato ciclasa.
GCp: guanilato ciclasa particulada
GCs: guanilato ciclasa soluble
Gi: proteína G inhibidora
GMPc: guanosina monofosfato cíclico
Gs: proteína G estimuladora
GTP: guanosina trifosfato
NO: Óxido Nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NPR-A: receptor tipo A de péptidos natriuréticos
NPR-B: receptor tipo B de péptidos natriuréticos
NPR-C: receptor tipo C de péptidos natriuréticos
PKA: proteína quinasa A
PKG: proteína quinasa G
SERCA 2: Bomba de calcio ATPasa del retículo sarcoplásmico de tipo 2
VASP: fosfoproteína activada por vasodilatadores

Síntesis Inicial

La transmisión de información desde el medio extracelular al intracelular, mediante la generación de segundos mensajeros, es fundamental para regular la actividad celular.

La activación de un receptor por un ligando activa ciclasas que generan AMPc y GMPc; estos estimulan proteínas cinasas específicas en compartimentos celulares selectivos y regulan diversas funciones fisiológicas, como las del sistema cardiovascular. Finalmente, las fosfodiesterasas controlan la terminación del efecto, regulando temporal y espacialmente los niveles de los nucleótidos cíclicos.

La disfunción en cualquier nivel de las vías de señalización puede originar enfermedades cardiovasculares, como hipertensión sistémica y pulmonar, aterosclerosis e hipertrofia cardíaca.

Los fármacos que modifican a las proteínas involucradas en la transducción de señales son de utilidad para la terapéutica de tales patologías.

INTRODUCCIÓN

La postulación de segundos mensajeros como mediadores en la transmisión de señales celulares le valió el Premio Nobel de 1971 en Fisiología/Medicina al Dr. Earl W. Sutherland, quien en 1957 descubrió las AC y su producto, el AMPc.¹ Ashman y colaboradores, en 1963, agregaron al GMPc como segundo mensajero y en 1969 se identificó la enzima GC.² Actualmente, se conoce que más del 20% del genoma humano codifica para proteínas relacionadas en la señalización intracelular.³

La estimulación de una vía de señalización altamente organizada necesita la unión de un ligando a un receptor a través del cual se generan segundos mensajeros, los que, a su vez, estimulan diversas proteínas involucradas en la señalización intracelular.³ La señal finaliza por acción de diferentes proteínas que regulan los niveles de los segundos mensajeros involucrados (fig. 17-1).

SUPERFAMILIA DE NUCLEÓTIDOS CICLASAS

Comprende a las AC y las GC, que transforman los nucleótidos lineales trifosfato ATP y GTP, respectivamente, en nu-

cleótidos monofosfato cíclicos AMPc y GMPc.⁴ Mientras que para la AC existen proteínas interpuestas en la transmisión de la señal (proteínas G), para las GC es la misma proteína la que se comporta como receptor y posee actividad catalítica.²

ADENILATO CICLASAS

Se identificaron nueve isoformas de AC (AC1-AC9) unidas a membrana (particuladas) y una isoforma soluble, con distintas propiedades regulatorias. Las isoformas particuladas poseen una actividad basal que puede incrementarse o disminuirse por unión a una GS o Gi, respectivamente.⁵ Otras isoformas (AC3-5) fueron identificadas en vesículas lipídicas (caveolas) produciendo localmente AMPc en microdominios de la membrana celular.^{3,5}

AMPc

La unión de un ligando extracelular a un receptor acoplado a proteína G permite que esta regule a las isoformas de AC, y active un dominio catalítico. Las AC transforman el AMP en segundo mensajero AMPc, cuyo blanco efector es

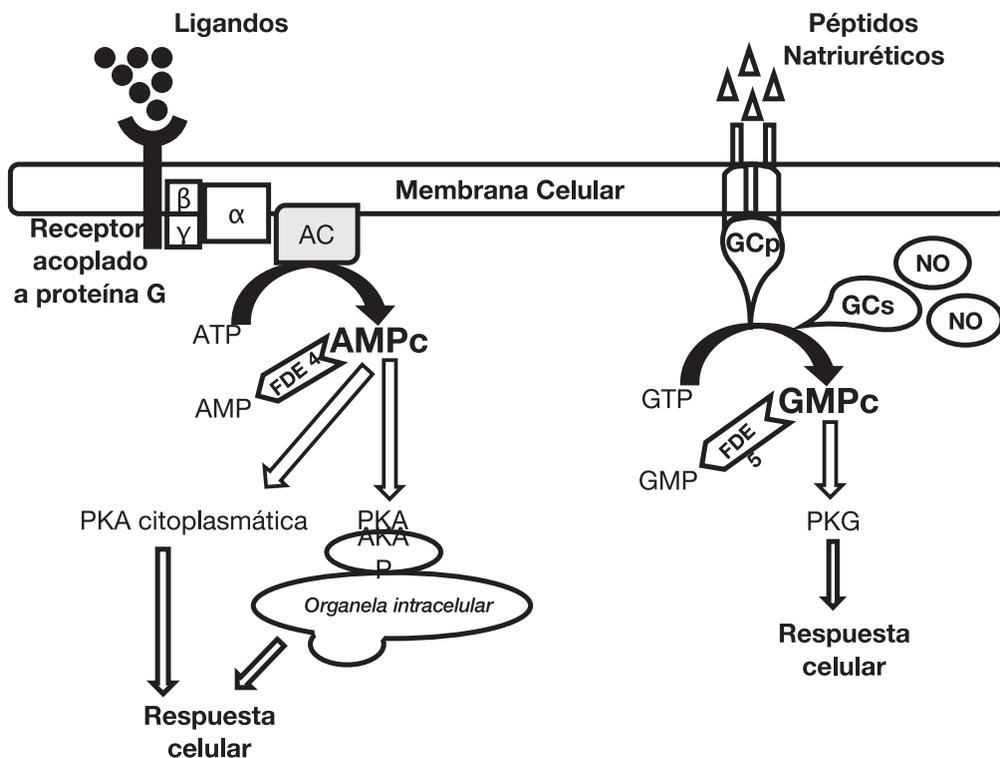


Figura 17-1. La unión del ligando a un receptor acoplado a proteína G activa la adenilato ciclasa (AC) ubicada en su proximidad y genera AMPc (parte izquierda de la figura). La concentración y distribución local del gradiente de AMPc está limitada por las fosfodiesterasas (FDE). El segundo mensajero AMPc activa a la enzima proteína quinasa A (PKA) que es la encargada de fosforilar la proteína blanco para desencadenar la respuesta celular. Las estructuras subcelulares pueden incorporar a la proteína quinasa A (PKA) a través de su anclaje mediante una proteína de específica (AKAP), mecanismo que sirve para localizar y limitar el conjunto de la vía a una zona definida cercana a la proteína blanco. Por su parte, la vía del GMPc (parte derecha de la figura) implica la unión de un ligando a su respectivo receptor de membrana (con actividad de guanilato ciclasa particulada, GCp) o en bien en forma directa a la GC soluble (en caso del óxido nítrico, NO). La activación de la GC genera GMPc como segundo mensajero de señalización, el que activa a su vez a la enzima proteína quinasa G (PKG) que es la encargada de fosforilar la proteína blanco para desencadenar la respuesta celular.

la PKA. La generación de AMPc es específica y dirigida, y finaliza mediante el control temporal y espacial ejercido por FDEs.⁴ Este control comprende la siguiente secuencia de eventos: 1) el efecto de AMPc se realiza por fosforilación de proteínas que son sustrato de la PKA; 2) la PKA, co-localizada con las FDEs, fosforila y activa a estas últimas; 3) la FDE activada degrada al AMPc y finaliza la señal, estableciendo un mecanismo de retroalimentación negativa.⁶ (fig. 17-1).

PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc

La PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas unidas no covalentemente a un dímero regulatorio, cuyo ensamble forma las isoformas PKA-I y PKA-II.^{3,5}

El AMPc se une a dos sitios (A y B) en cada subunidad regulatoria. La unión de cuatro AMPc, dos a cada subunidad, induce cambios conformacionales que generan un dímero regulatorio con cuatro moléculas de AMPc enlazadas y dos monómeros catalíticos. Así, las subunidades catalíticas se activan y fosforilan residuos serina y treonina en proteínas blanco específicas.⁶

La ubicación subcelular de la PKA está determinada por el anclaje de las subunidades regulatorias a las proteínas AKAPs (A kinase anchoring proteins). La PKA-I es soluble y citoplasmática, y la PKA-II es particulada y confinada a estructuras subcelulares y anclados en compartimentos por las AKAPs.^{3,6}

Las proteínas AKAP

Se unen a la PKA y a las FDEs, colocándolas en un compartimento subcelular para permitir que la PKA fosforile solo a proteínas cercanas a su entorno, regulando así temporal y espacialmente los eventos señalizados por PKA. En cardiomiocitos, la AKAP se une tanto a la FDE-4D3 como a la PKA-II en la región perinuclear.⁶ Esta co-localización PKA/FDE permite el control espacial de la señalización PKA mediante su anclaje a AKAP y el control temporal, mediante la terminación de la señal AMPc por las FDEs.^{1,6}

Procesos celulares y funciones orgánicas reguladas por la vía AMPc-PKA

La señalización AMPc-PKA regula numerosos procesos fisiológicos celulares, como ser: el ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, regulación dinámica de los microtúbulos, condensación de cromatina, ensamblaje de la envoltura nuclear, regulación del transporte intracelular y flujo de iones en prácticamente todos los tejidos.³ Regula también la exocitosis en células epiteliales polarizadas e incide así en patologías como la diabetes insípida y mellitus, la hipertensión, tiroideopatías y asma. Es la principal vía de señalización de los receptores β -adrenérgicos del sistema cardiovascular y del tejido adiposo. Está implicada en la regulación de

la esteroidogénesis, la función reproductiva, la modulación de la respuesta inmune y otros efectos evocados por hormonas, neurotransmisores y diversos ligandos paracrinos.³

Las sustancias endógenas que señalizan a través del AMPc pueden impactar sobre la regulación de la presión arterial de las siguientes maneras:

Directa: como las catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina renal a través de los receptores β y D1 respectivamente), las hormonas tiroideas, las prostaglandinas, la renina, la vasopresina y la angiotensina II.

Indirecta: TRH y TSH (a través de la liberación de hormonas tiroideas), CRH y ACTH (a través de la liberación de cortisol).

La prolactina, las gonadotropinas hipofisarias, paratohormona, calcitonina y glucagon no inciden sobre la presión arterial, pero señalizan por la misma vía.^{1,3,6}

AMPc y función cardiovascular

La estimulación de receptores β -adrenérgicos activa una proteína Gs que estimula a la AC y produce AMPc, que, a su vez, activa a la PKA. Esta fosforila proteínas relacionadas al acoplamiento excito-contráctil como los canales de calcio tipo L, el receptor de rianodina, la troponina I y la proteína C acoplada a miosina, regulando el flujo de calcio. Además, la PKA fosforila la proteína fosfolamban, que regula la actividad de SERCA2 e incrementa la recaptación de calcio al retículo sarcoplásmico, proceso alterado en la insuficiencia cardíaca. Tanto el receptor beta como los canales de calcio tipo L están asociados a las proteínas AKAPs presentes en el corazón.³

Regulación de otros procesos

Las hormonas ACTH, luteinizante y foliculo-estimulante regulan la biosíntesis de esteroides en glándula suprarrenal (cortisol) y gónadas (estrógenos, progesterona y testosterona) a través de AMPc-PKA. La biosíntesis de esteroides implica un aumento AMPc-dependiente de la liberación de colesterol a partir de lípidos de membrana y su transporte a la mitocondria para proporcionar el sustrato para la citocromo P450sc.³

La metabolización de los triglicéridos a ácidos grasos libres (lipólisis) es la principal ruta metabólica para liberar la energía almacenada. En adipositos, este proceso se incrementa por fosforilación de la lipasa hormonosensible dependiente de PKA. Las catecolaminas se unen a receptores β -adrenérgicos, estimulando la lipólisis y la termogénesis, vía AMPc-PKA o la cascada de la MAP-cinasa, a través de proteínas Gs y Gi, respectivamente.³

La fosforilación reversible por PKA y PKC de proteínas específicas aumenta la secreción de insulina por las células beta pancreáticas. El efecto del AMPc depende del acoplamiento de la PKA con la proteína AKAP79.

La fosforilación por PKA también regula la reabsorción tubular de agua. La hormona antidiurética estimula receptores de las células principales de los túbulos colectores, produciendo AMPc y activando la PKA, que fosforila directamente al canal de agua (acuaporina-2), translocándolo desde vesículas intracelulares a la membrana apical, sin alterar la permeabilidad.³

GUANILATO CICLASAS

Comprenden una subfamilia integrada por la GCp, asociada a la membrana plasmática y la GCs, localizada en el citosol.⁷ Las dos GC se interrelacionan para regular la homeostasis vascular y otros procesos GMPc-dependientes.

Las GC presentan homología estructural con la AC y otras proteínas con actividad de tirosina-fosfatasa y tirosina-cinasa.²

Los ligandos que se unen a las GC producen un cambio conformacional que activa la zona catalítica del extremo carboxilo terminal mediante la formación de un homo o heterodímero, según se trate de la GCp o la GCs, respectivamente.^{2,7}

Guanilato Ciclasas particuladas

En mamíferos existen siete isoformas denominadas GCp A-G, en forma monomérica u homodimérica, siendo siempre la forma activa un homodímero.

Las GCp-A y GC-B se localizan en endotelio vascular, corazón y riñón y son estimuladas por los péptidos natriuréticos ANP, BNP y CNP. Los dos primeros se unen a la GCp-A y el tercero a la GCp-B, denominados receptores NPR-A y NPR-B, respectivamente. Existe un tercer receptor (NPR-C) que carece de actividad GC intrínseca, por lo que no altera los niveles de GMPc.

Las GCp presentan en su estructura un dominio extracelular de unión a ligandos, un segmento transmembrana y un dominio intracelular citoplasmático compuesto por un subdominio homólogo de cinasa (que contiene la región a la que se une el ATP mediante un efecto alostérico y aumenta la activación de la GC) y otro catalítico (que presenta el sitio activo con actividad GC para la síntesis del GMPc). La unión de los péptidos natriuréticos al dominio extracelular produce cambios conformacionales que generan las señales de transducción transmembrana.⁷

La GCp C está en intestino y riñón y es estimulada por la enterotoxina termoestable bacteriana y la guanilina. Las restantes GCp (D a G) carecen de agonistas conocidos y se ubican en bulbo olfatorio, retina, pulmón, intestino y músculo esquelético.⁷

Guanilato Ciclasas solubles

La GCs es una hemoproteína citosólica formada por dos subunidades (α y β). En el ser humano, se expresan los heterodímeros $\alpha\beta 1$ y el $\alpha\beta 2$; el primero es la forma activa y mayoritaria, que coexiste con homodímeros inactivos en un equilibrio fisiológico.

El principal activador endógeno de la GCs es el NO, que se une al grupo hemo (protoporfirina IX unida a ion ferroso) de la subunidad $\beta 1$. El complejo Fe-NO formado altera la conformación molecular de las subunidades y produce el efecto catalítico que activa a la GCs.

Tal como la GCp y la AC, las GCs, se localizan en células mesenquimales y endoteliales, controlando la actividad vascular. Se encuentran también en las plaquetas e inhiben su activación.²

GMPc

Cuando se estimulan las GC, se incrementa el GMPc, activando diversos sustratos, como la PKG, canales iónicos y FDEs, amplificando y regulando la cascada de señalización intracelular (fig. 17-1).^{2,7}

La vía de señalización GC-GMPc modula procesos fisiológicos relacionados con la regulación de la presión arterial, como la relajación del músculo liso (sistema cardiovascular), la natriuresis y diuresis (riñón) y la neurotransmisión periférica y central (sistema nervioso).⁸

PROTEÍNAS CINASAS DEPENDIENTES DE GMPc

Se identificaron dos PKG (I y II), con diversas isoformas. La PKG-I tiene una isoforma α y una β y es el isotipo principal en el sistema cardiovascular. La PKG-II se expresa en células yuxtglomerulares, túbulos proximales renales, mucosa intestinal, cerebro y huesos.

Ambas PKG existen como homodímeros con estructuras idénticas. Cada monómero presenta tres dominios funcionales: el amino terminal, uno regulador y uno cinasa. El primero modula la homodimerización de PKG, suprime la actividad del dominio cinasa en ausencia de GMPc e interactúa con proteínas específicas. Cuando el GMPc se une al dominio regulatorio, la PKG sufre cambios conformacionales que producen la desinhibición del dominio cinasa ejercido por el dominio amino terminal, y fosforila entonces una serina/treonina de las proteínas sustrato.

La ubicación subcelular de las PKG depende de la modificación del extremo amino terminal. Así, la acetilación de la PKG-I la hace soluble y de localización citosólica, mientras que la miristoilación determina su asociación a membrana.⁹

REGULACIÓN DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR POR GMPc

La disfunción en cualquier nivel de la vía de señalización por GMPc es un factor patológico en muchas enfermedades cardiovasculares, como hipertensión sistémica y pulmonar, aterosclerosis, disfunción del músculo liso, insuficiencia coronaria, hipertrofia cardíaca, cardiomiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca. La señalización disfuncional del GMPc también origina un metabolismo mitocondrial alterado, presente en las cardiopatías.⁷

En las células del músculo liso vascular, la señalización GMPc-PKG regula la motilidad celular, la migración y la proliferación, procesos vitales para la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Por otro lado, la PKG-I estimula la relajación muscular al reducir el Ca^{2+} citosólico libre por fosforilación del receptor del inositol trifosfato, inhibición de la liberación de Ca^{2+} o incremento de su compartimentalización intracelular. Activa también a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina y a canales iónicos, disminuyendo más el Ca^{2+} intracelular y produciendo la relajación muscular.

Finalmente, en miocitos aislados de ratones knockout para PKG-I se demostró que los análogos de GMPc carecen de efecto sobre la fuerza de contracción del miocardio, mientras que en animales normales la reducen.⁸

Hipertensión

La liberación de NO regula el tono de los vasos a través del GMPc. Las situaciones que disminuyen los niveles de NO incrementan la resistencia sistémica y la presión arterial. Esto se observa en modelos experimentales de deficiencias de enzimas de señalización por NOS, de atrapamiento por mayor producción de anión superóxido, de desacoplamiento de la NOS endotelial (elevada expresión de enzima y reducida producción de NO) y depleción del cofactor tetrahidropteridina o de su biodisponibilidad.

Farmacológicamente, se puede inducir vasodilatación por aumento de GMPc mediante el uso de fármacos activadores de la GC, como nitratos, dadores de NO o activadores hemo-dependientes o independientes.

FOSFODIESTERASAS DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS

Según la secuencia aminoacídica, especificidad por el sustrato, características reguladoras alostéricas y propiedades farmacológicas, se identificaron once familias de FDEs (FDE-1 a 11) con más de 50 isoformas diferentes. Cada una rompe el enlace fosfodiéster de los nucleótidos cíclicos (formando GMP o AMP lineal) y regula los niveles intracelulares, finalizando la acción de estos.^{6,10}

Las FDEs actúan sobre uno o ambos nucleótidos cíclicos y, a su vez, pueden ser activadas o inhibidas por ellos, generando mecanismos de retroalimentación. En este sentido, las FDEs-4, 7 y 8 son específicas para AMPc; las FDEs-5, 6 y 9 para GMPc y las FDEs-1, 2, 3, 10 y 11, para ambos. Por otra parte, el GMPc regula la actividad de FDE-2, 3, 5 y 9 y el AMPc de las FDE-1 y 4. Como ejemplo, el GMPc, al unirse a dominios regulatorios del extremo amino terminal de la FDE-2, cambia su conformación, y aumenta su actividad enzimática por el AMPc. En los canales de calcio tipo L de cardiomiocitos (responsables de los efectos cronotrópicos e inotrópicos producidos por estimulación

del receptor β -adrenérgico, y la consecuente activación de la vía AMPc/PKA), al activarse la FDE-2, el GMPc puede reducir la señal del AMPc y afectar la función cardíaca, por lo que la acción dual de esta FDE permite mediar negativamente un entrecruzamiento (crosstalk) entre las vías del GMPc y del AMPc.

Al encontrarse las FDEs localizadas y reclutadas en complejos multiproteicos de compartimentos subcelulares, establecen gradientes locales de AMPc y GMPc que contribuyen a la especificidad temporal y espacial de la señalización del nucleótido cíclico y a la finalización de sus efectos. Por ejemplo, pese a la baja expresión de FDE-8 en cardiomiocitos⁶, su localización subcelular le permite regular el efecto del AMPc sobre el proceso excitación-relajación y modular los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

La FDE-5 hidroliza selectivamente GMPc, regulando la contracción del músculo liso. En miocitos, esta FDE modula la respuesta hipertrofica por sobrecarga de presión, la remodelación posinfarto y la señalización de supervivencia celular y apoptosis asociadas a isquemia/reperfusión. Por su parte, la FDE-3 de acción dual regula la contracción y relajación cardíaca vía canales de calcio tipo L e interviene en el cambio fenotípico del músculo liso vascular y la respuesta al estrés.¹⁰

La inhibición farmacológica de las FDEs (con sildenafil, vardenafil, tadalafil, etc.) es sugerida para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión pulmonar, aterosclerosis e insuficiencia cardíaca crónica y para otras patologías, como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, trastornos neurológicos y disfunción eréctil.^{6,10}

Bibliografía sugerida

1. Tresguerres, M.; Levin, L.R. y Buck, J. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int* 2011; 79(12):1277-1288.
2. Derbyshire, E.R. y Marletta, M.A. Structure and Regulation of Soluble Guanylate Cyclase. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 533-559.
3. Taskén, K. y Aandahl, E.M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 2004; 84(1):137-167.
4. Morgado, M.; Cairrão, E. y col. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(2):247-266.
5. Cooper, D.M. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J* 2003; 375(Pt 3):517-529.
6. Mika, D.; Leroy, J. y col. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 52(2):323-329.
7. Garbers, D.L.; Chrisman, T.D. y col. Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol Metab* 2006 17: 251-258.
8. Tsai, E.J. y Kass, D.A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* 2009; 122: 216-238.
9. Francis, S.H.; Busch, J.L. y Corbin, J.D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 525-563.
10. Francis, S.H.; Blount, M.A. y Corbin, J.D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev* 2011; 91: 651-690.