

AMP cíclico y Medicina (*)

POR

JOSE A. LOZANO TERUEL

1. GENERALIDADES

Quizá una de las principales características de nuestro tiempo es la de ser la época de la información, tan abundante que llega a inundarnos y aturdirnos, siendo muy difícil el hallazgo de hipótesis unificadoras que ayuden a encontrar síntesis claras de las diferentes situaciones. Por ello el caso del AMP cíclico (AMPc) es especialmente notable, ya que ha hecho posible una generalización brillante que ha conseguido una simplificación radical de la Endocrinología no esteroidea de los vertebrados, haciendo realidad el sueño de los endocrinólogos de conocer cómo trabaja una hormona y confirmando, por otra parte, su predicción de que las hormonas podrían regular el comportamiento de las enzimas.

Está generalizado el pensar que la investigación clínica se beneficia inevitablemente de los descubrimientos efectuados en las disciplinas básicas. De que ello no siempre es así, es un buen ejemplo el de la adenilciclase y AMPc, que fueron primeramente temas de interés para los clínicos dedicados a la diabetes o a la regulación hormonal de la glucogenolisis, para transformarse posteriormente en un campo de obtención de fascinantes hallazgos básicos, con la interesante consecuencia de que aunque la mayor contribución de los resultados obtenidos de los estudios sobre este nucleótido ha sido para aspectos endocrinológicos y farmacológicos de la Medicina, sin embargo también están siendo muy favorablemente afectadas otras especialidades como cardiología, neurología, ginecología, oncología, etc.

(*) Discurso de ingreso en la Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia el 7 de marzo de 1977.

2. DESCUBRIMIENTO

Earl W. Sutherland, fallecido recientemente, fue quien hace unos 30 años comenzó a recorrer, en la Universidad de Washington, el camino que le conduciría, en 1971, a la obtención del premio Nóbel de Fisiología y Medicina por sus investigaciones sobre el sistema enzimático adenilciclasa, responsable de la síntesis del AMPc.

El problema básico que tenían planteado Sutherland, Rall y otros colegas era el del conocimiento de cómo el glucagón o la adrenalina producían la movilización del glucógeno hepático, lo que ocasionaba un aumento en la glucemia. Ya en 1957 estuvieron en condiciones de demostrar que la aplicación de hormonas glucogenolíticas a cortes hepáticos y homogenados, provocaba la acumulación de un nucleótido adenílico termolabile y dializable que, en ciertas condiciones, era capaz de convertir la fosforilasa, enzima degradativa del glucógeno, desde su forma inactiva hasta otra forma activa (1). Sus investigaciones comprobaron que la señal activadora era una molécula relativamente sencilla, el 3',5'-adenosin

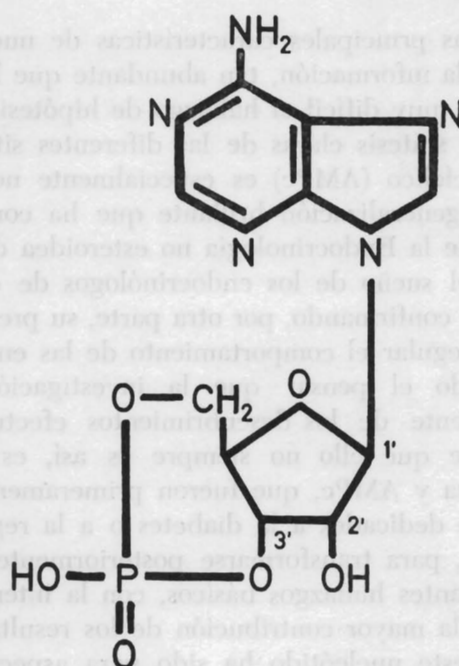


FIGURA 1. Molécula de 3',5' AMPcíclico

(1) T. W. Rall, E. W. Sutherland y I. Berthet; *J. Biol. Chem.*, 224, 463, 1957.

monofosfato cíclico (2-4), en la que una base purínica, la adenina, estaba ligada al azúcar ribosa, que se unía por los lugares 3' y 5' con un grupo fosfato, en enlaces tipo fosfodiéster (Figura 1). Desde entonces el trabajo de numerosos laboratorios ha establecido tanto la ubicuidad del AMPc en los seres vivos, como la catolicidad de sus funciones reguladoras, hallando confirmación el concepto de Sutherland de considerar al AMPc como el "segundo mensajero" hormonal (5) hipótesis que afirmaba que este nucleótido cíclico mediaba los efectos de un gran número de hormonas y otros agentes biológicamente activos.

La trascendencia de esta concepción se hace patente al considerar el incremento explosivo del número de publicaciones relacionadas con el AMP cíclico, que sigue una curva exponencial (Figura 2). Así, en 1973,

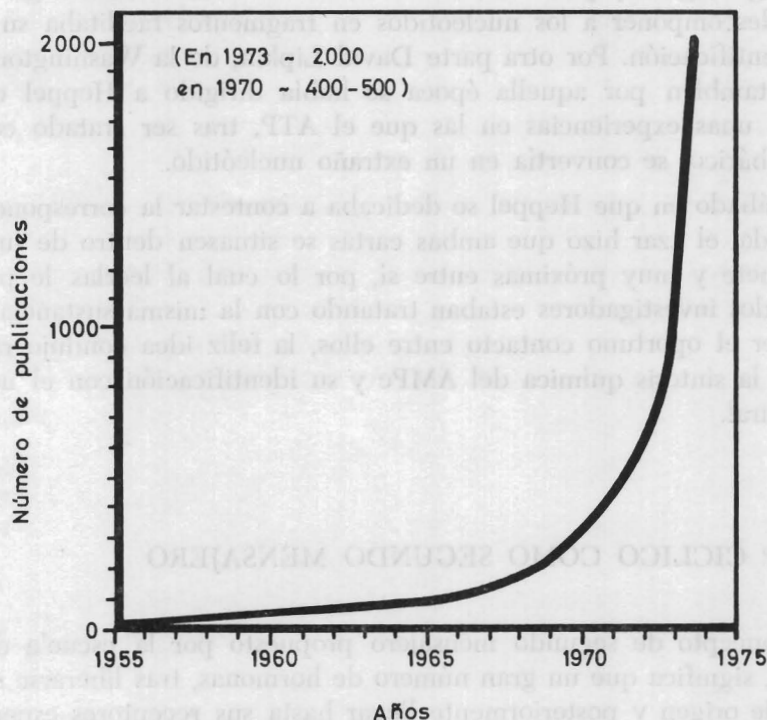


FIGURA 2. Número de publicaciones sobre AMPcíclico

- (2) E. W. Sutherland y T. W. Rall; *J. Biol. Chem.*, 232, 1007, 1957.
 (3) D. Lipkin, W. H. Cook y R. Markham; *J. Amer. Chem. Soc.*, 81, 6198, 1957.
 (4) T. W. Rall y E. W. Sutherland; *J. Biol. Chem.* 232, 1065, 1957.
 (5) O. A. Robinson, R. W. Butcher y E. W. Sutherland; *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 149, 1968.

aparecieron más de 2.000 trabajos de investigación sobre el tema, una docena de libros y comenzó a publicarse una serie anual de monografías y una revista especializada.

La identificación del factor termostable aislado por el grupo de Sutherland y que era capaz de aumentar la actividad fosforilasa, se debió en parte a una curiosa coincidencia en que intervino Leon A. Heppel del National Institute of Health, quien había desarrollado muchos métodos de los utilizados para preparar e identificar nucleótidos. Respecto a su correspondencia menos urgente, la costumbre de Heppel era la de ir acumulándolas sobre la mesa de su despacho, separando los montones con hojas de papel sueltas y contestando a todas las cartas cada dos o tres meses. Sutherland le escribió a Heppel explicando las experiencias sobre el glucógeno y pidiéndole una muestra de una enzima degradativa que al descomponer a los nucleótidos en fragmentos facilitaba su estudio e identificación. Por otra parte David Lipkin, de la Washington University, también por aquella época se había dirigido a Heppel describiéndole unas experiencias en las que el ATP, tras ser tratado con hidróxido bórico, se convertía en un extraño nucleótido.

Un sábado en que Heppel se dedicaba a contestar la correspondencia acumulada, el azar hizo que ambas cartas se situasen dentro de un mismo paquete y muy próximas entre sí, por lo cual al leerlas le pareció que los dos investigadores estaban tratando con la misma sustancia. Tras establecer el oportuno contacto entre ellos, la feliz idea condujo rápidamente a la síntesis química del AMPc y su identificación con el nucleótido natural.

3. AMP CICLICO COMO SEGUNDO MENSAJERO

El concepto de segundo mensajero propuesto por la escuela de Sutherland, significa que un gran número de hormonas, tras liberarse de sus células de origen y posteriormente llegar hasta sus receptores específicos situados sobre (o cerca de) la superficie de las células receptoras, poseen la misión de influir en la actividad adenilciclase de estas células, lo que se traduce en un aumento del AMPc a nivel intracelular, que actúa sobre uno o más sistemas en el interior de la célula, produciendo el efecto que normalmente se considera asociado con la hormona de que se trate. De este modo esa hormona funciona como un primer mensaje y el AMPc como el segundo mensajero (Figura 3).

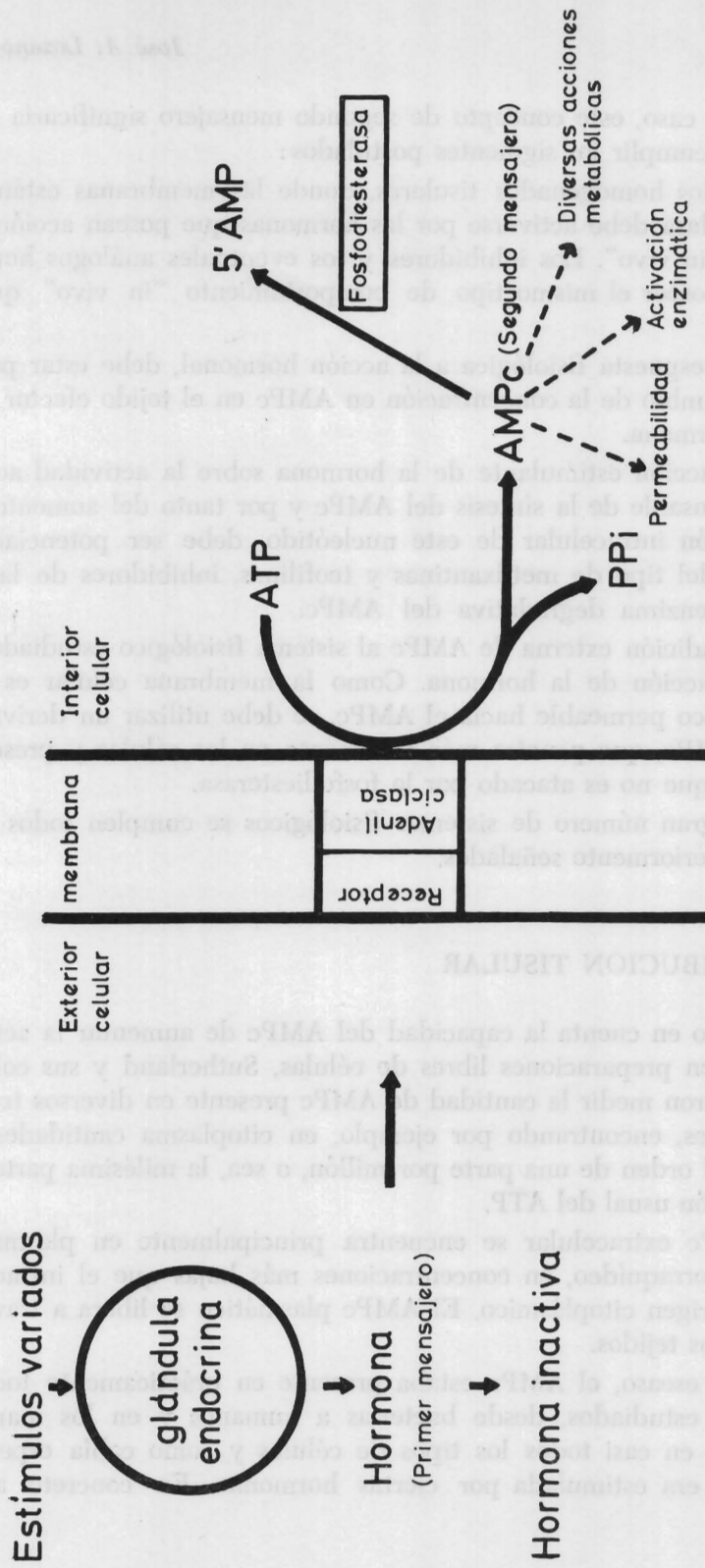


Figura 3. Concepto de AMPc como 2.º mensajero

En todo caso, este concepto de segundo mensajero significaría que se tienen que cumplir los siguientes postulados:

1. En los homogenados tisulares, donde las membranas están rotas, la adenilciclase debe activarse por las hormonas que posean acción sobre ese tejido "in vivo". Los inhibidores y los eventuales análogos hormonales deben poseer el mismo tipo de comportamiento "in vivo" que "in vitro".

2. La respuesta fisiológica a la acción hormonal, debe estar precedida por el cambio de la concentración en AMPc en el tejido efector donde actúa la hormona.

3. La acción estimulante de la hormona sobre la actividad adenilciclase, responsable de la síntesis del AMPc y por tanto del aumento de la concentración intracelular de este nucleótido, debe ser potenciada por sustancias del tipo de metilxantinas y teofilinas, inhibidores de la fosfodiesterasa, enzima degradativa del AMPc.

4. La adición externa de AMPc al sistema fisiológico estudiado debe simular la acción de la hormona. Como la membrana celular es relativamente poco permeable hacia el AMPc, se debe utilizar un derivado, el dibutiril-AMPc, que penetra más fácilmente en las células y presenta la ventaja de que no es atacado por la fosfodiesterasa.

En un gran número de sistemas fisiológicos se cumplen todos los requisitos anteriormente señalados.

4. DISTRIBUCION TISULAR

Teniendo en cuenta la capacidad del AMPc de aumentar la actividad fosforilasa en preparaciones libres de células, Sutherland y sus colaboradores pudieron medir la cantidad de AMPc presente en diversos tejidos y localizaciones, encontrando por ejemplo, en citoplasma cantidades aproximadas del orden de una parte por millón, o sea, la milésima parte de la concentración usual del ATP.

El AMPc extracelular se encuentra principalmente en plasma y líquido cefalorraquídeo, en concentraciones más bajas que el intracelular, y con un origen citoplásmico. El AMPc plasmático se libera a través del riñón y otros tejidos.

Aunque escaso, el AMPc estaba presente en prácticamente todos los organismos estudiados, desde bacterias a humanos y en los mamíferos se encontró en casi todos los tipos de células y como cabía esperar, su producción era estimulada por ciertas hormonas. En concreto abunda

más en cerebro que en hígado, músculo, corteza adrenal, ovario, etc., y en el resto de tejidos se encuentra más escaso.

En el hombre en estado normal, el plasma sanguíneo contiene de 10-25 nmoles/l., el líquido cefalorraquídeo de 5-22 nmoles/l., mientras que en líquido seminal los valores son más altos: 100 nmoles/l. Como cada día se eliminan por la orina de 75 a 375 nmoles de AMPc, y el aclaramiento renal de AMPc es superior a la cantidad de este nucleótido que se inyecta, radioactivo, a personas sanas, ello significa que al menos una parte del AMPc se sintetiza y elimina directamente por el riñón, habiéndose evaluado esa síntesis en un 40% del AMPc urinario total. Por otra parte el tiempo de semidesaparición del AMPc radioactivo del plasma, tras inyección intravenosa, es aproximadamente 30 minutos.

En cualquier caso la eliminación urinaria del AMPc se exalta considerablemente por el glucagón y la hormona paratiroidea, así como por el ejercicio físico y, de este modo, tras una marcha de 10-15 kms., aumenta al doble la concentración del AMPc en la orina, independientemente del valor del volumen urinario.

5. METODOS ANALITICOS

La determinación cuantitativa del AMPc puede llevarse a cabo principalmente mediante 4 técnicas diferentes: cromatografía/electroforesis; ensayos enzimáticos; métodos de enlace y radioinmunoanálisis.

Aunque existen gran número de procedimientos cromatográficos y electroforéticos para separar y medir el AMPc (6-8), se debe tener en cuenta su relativo engorro y gasto de tiempo. En cuanto a los ensayos enzimáticos pueden ser muy variados. Uno de ellos se basa en la activación de la fosforilasa del glucógeno, mediante la activación de la quinasa de la fosforilasa b, que a su vez es activada por el AMPc, siendo en las condiciones adecuadas, la velocidad de activación una función de la concentración del AMPc.

Los radioinmunoanálisis específicos para el AMPc (9) se basan en la competición por el lugar de enlace de un anticuerpo dirigido contra el AMPc y el ensayo es suficientemente específico para poder evitar la necesidad de una separación cromatográfica previa del AMPc del resto de

(6) M. Tao, F. Lipmann; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 63, 86, 1969.

(7) L. W. Bradham y D. W. Woolley; Biochim. Biophys. Acta 93, 475, 1964.

(8) G. Krishna, B. Weiss y B. B. Brodie; J. Pharmacol. Exp. Ther., 163, 379, 1968.

(9) A. L. Steiner, D. M. Kipnis, R. Utiger y C. W. Parker; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 367, 1969.

los otros nucleótidos, por lo cual y por su rapidez, este método de radioinmunoanálisis es quizás el que se ha distribuido más ampliamente.

El AMPc de extractos tisulares, sin purificación previa, también se puede medir tomando como base su capacidad para competir con ^3H -AMPc para enlazarse a una protein quinasa purificada parcialmente y dependiente de AMPc (10).

6. SISTEMA ADENILCICLASA

El AMPc se sintetiza a partir del ATP mediante la acción catalítica de un sistema enzimático que se llamó adenilciclase, aunque un nombre trivial más apropiado sería el de adenilato ciclase, necesitándose iones magnesio en la reacción que, como segundo producto, aparte del AMPc, produce pirofosfato. En el proceso $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{AMPc} + \text{PPi}$ el valor de la constante de equilibrio es $K_e = 0,065$, lo que significa un cambio de energía libre standard $\Delta G'_0 = -RT \ln K_e = +1,63 \text{ K cal/mol}$. lo que indica, por su ligero endergonismo, que el proceso puede ser reversible bajo condiciones adecuadas. Pero si esta reacción se acopla a la acción de una pirofosfatasa que hidrolice el pirofosfato producido, el cambio global de energía libre sería negativo y el equilibrio estaría desplazado hacia la formación del AMPc.

Por otra parte es muy importante considerar una segunda reacción $\text{ATP} \rightleftharpoons 5'\text{AMP} + \text{PPi}$, con $\Delta G'_0 = -10,3 \text{ K cal/mol}$, lo que permite deducir claramente que el proceso $\text{AMPc} \rightleftharpoons 5'\text{AMP}$ lleva asociado un cambio de energía libre $\Delta G'_0 = -11.900 \text{ cal/mol}$, o sea más exergónico que la propia hidrólisis del ATP, lo que permite considerar al AMPc como un compuesto de alta energía de hidrólisis, por lo cual presenta posibilidades energéticas para que se acople el proceso hidrolítico a transformaciones que sean deficitarias energéticamente, como ciertas transformaciones metabólicas, cambios conformacionales en proteínas, etcétera.

La actividad adenilil ciclase parece estar restringida, en la mayoría de las células de mamífero, a las membranas celulares y se activa en presencia de ciertas hormonas que se acoplan a receptores específicos situados en la parte externa de la membrana celular. Por otra parte la enzima se activa en presencia del fluoruro cuando está en forma de homogenado tisular, pero no lo hace en células intactas.

La naturaleza particulada de la enzima la hace difícilmente soluble y

(10) A. G. Gilman; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 67, 305, 1970.

purificable y su peso molecular parece estar situado entre 100.000 y 200.000 daltons, habiéndose identificado en prácticamente todos los órganos animales (a excepción de los eritrocitos maduros de mamífero), en ciertas plantas y en numerosos microorganismos.

En la tabla I se señalan algunas hormonas que ejercen efectos activadores sobre la adenilato ciclasa "in vivo" o "in vitro", siendo tal activación muy rápida e intensa, sobre todo "in vivo". Así la hormona adrenocorticotropa aumenta la actividad del enzima 3-4 veces en homogenados de corteza suprarrenal de rata y varios centenares de veces si se inyecta la hormona al animal vivo. Como valor usual se puede considerar que la estimulación se produce en un segundo y que los incrementos de actividad corresponden a un factor 10 de multiplicación y como las concentraciones hormonales son del orden de 10^{-12} — 10^{-9} M en plasma y la acción de adenilciclasa consigue aumentos en el AMPc desde 10^{-7} a 10^{-5} M, eso significa que el sistema adenilciclasa amplifica la señal de entrada por un factor del orden de 10.000 ó 100.000, habiéndose comparado el sistema a un conjunto operacional formado por un discriminador-seleccionador de señales externas acoplado a un transductor que convierte la señal y la lleva a un amplificador de donde emerge la señal de salida, tal como se muestra en la Figura 4.

Las hormonas ejercen su influencia sólo a nivel de sus órganos efectores. Así la parathormona no estimula la enzima en el riñón más que en el tejido cortical y la vasopresina sólo lo hace sobre el tejido medular. Más aún, la adenil ciclasa de corteza adrenal responde a ACTH pero no a glucagón mientras los hepatocitos son sensibles a glucagón y no a ACTH, y en tejido adiposo la enzima se activa por ACTH, glucagón, adrenalina, prolactina, TSH, etc. La posible interpretación de este hecho sería la de pensar conforme con Sutherland, en una enzima de tipo alostérico con una unidad catalítica situada hacia el interior de la célula y una (s) unidad (es) reguladora (s) situada (s) hacia el exterior, donde estarían emplazados los receptores específicos hormonales (Figura 3), de modo que una hormona determinada se puede fijar específicamente en cierto tejido sobre la subunidad reguladora, activando la subunidad catalítica gracias, posiblemente, a una modificación estructural. El papel del fluoruro quedaría claro si actuase directamente sobre la subunidad catalítica.

Otro dato de interés es el papel, probablemente funcional, que poseen los nucleótidos de guanina, tal como GTP, para la regulación del sistema adenilato ciclasa, probablemente debido a que se trata de una enzima alostérica con múltiples estados termodinámicos de enlaces a ligandos, entre los cuales los nucleótidos de guanina pueden ejercer efec-

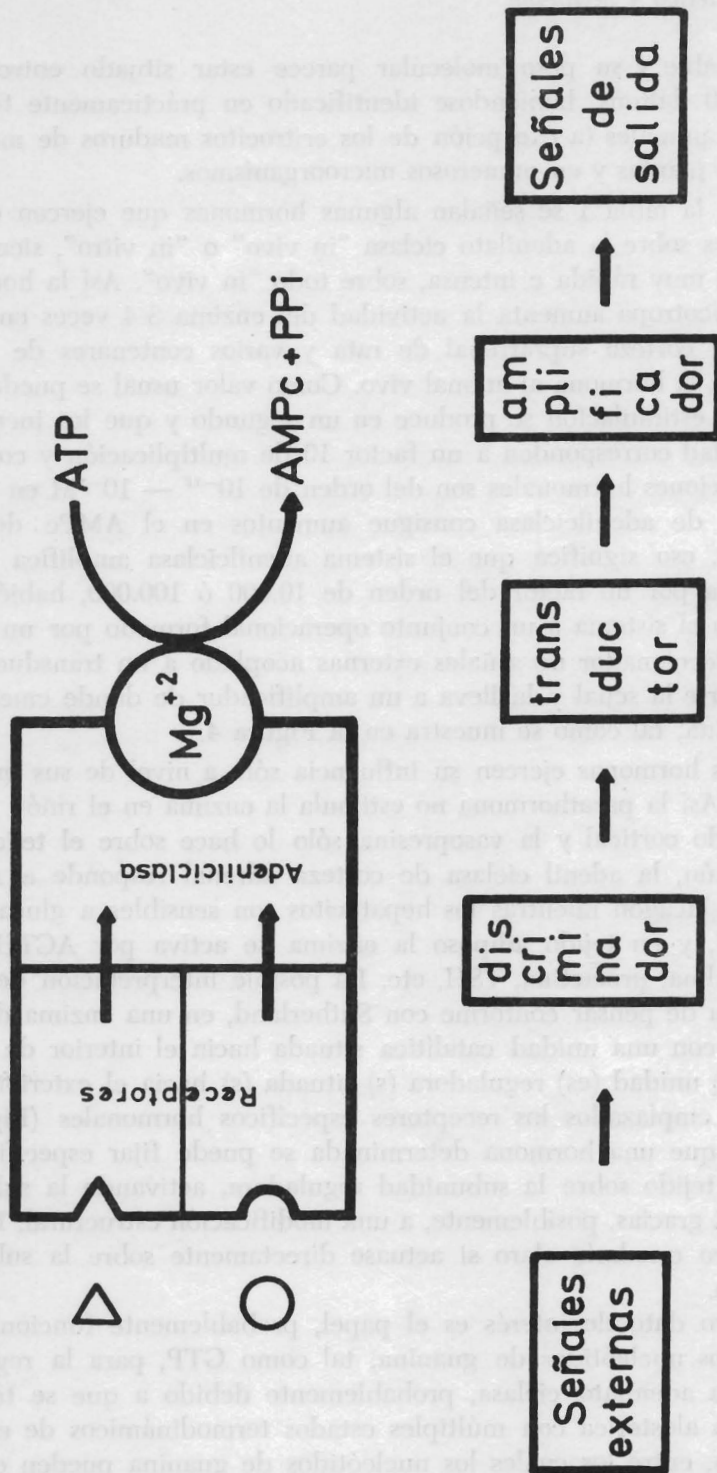


FIGURA 4. Modelo operacional de la adenilato ciclasa

tos activadores o inhibidores dependiendo de las circunstancias particulares.

TABLA 1. ALGUNOS PROCESOS MEDIADOS POR AMPc

TEJIDO U ORGANNO	HORMONA O SIMILAR	FUNCION
Adrenal	ACTH	Secreción Hidrocortisona.
Cerebelo	Noradrenalina	Excitación células Purkinje.
Corazón	Adrenalina-glucagón	Aumento velocidad. Contrac- tilidad.
Diversos	Prostaglandinas	Diversas.
Ganglio superior cervical	Dopamina	Regulación transmisión sináptica.
Graso	Adrenalina, ACTH, TSH, LH, glucagón	Lipolisis.
Hepático	Adrenalina, glucagón	Glucogenolisis.
Huesos	Parathormona Tirocalcitonina	Osteolisis Metabolismo de Ca ²⁺ y fosfato
Intestino	Secretina	Secretora.
Isletas pancreáticas	Glucagón	Secreción insulina.
Mucosa gástrica	Histamina, pentagastrina	Secreción ácida.
Melanocitos	MSH	Secreción melanosomas, melagénesis.
Músculo	Adrenalina	Glucogenolisis.
Nervio	Serotonina	Transmisión impulso nervioso.
Organos sexuales masculinos	Testosterona	Diversas.
Ovario	LH	Secreción progesterona.
Páncreas	Glucagón, secretina	Diversas metabólicas.
Parótida	Noradrenalina	Secreción amilasa.
Pituitaria anterior	Factores liberación hipotálamo	Secreción hormonas tróficas.
R I Ñ O N		
Médula	Eritropoyetina; vasopresina	Eritropoyesis; osmolalidad urinaria.
Corteza	Parathormona	Fosfaturia, AMPc-uria
Tiroide	TSH	Secreción tiroxina.
Útero	Estrógenos	Diversas.

En todo caso se ha de señalar (11) que aunque en los últimos años se ha demostrado la presencia de adenilato ciclasa en innumerables tipos de células, sin embargo se han hecho pocas observaciones fundamentales

(11) M. E. Maguire, T. W. Sturgill y A. G. Gilman; *Metabolism*, 24, 287, 1975.

sobre el sistema, desde que sus propiedades más relevantes fueron señaladas entre 1957 y 1962 y hoy día siguen sin aclarar totalmente aspectos tan cruciales como su naturaleza monomérica, polimérica o de complejo multienzimático. Quizás la razón de esta situación sea la de que una gran proporción del trabajo publicado se ha dedicado a la demostración de los efectos de diferentes agentes sobre adenilato ciclasa en todo el amplio aspecto de los seres vivos, mientras que para aclarar la complejidad del sistema adenilato ciclasa se necesita una aproximación diferente cual puede ser el análisis intensivo de un número muy limitado de sistemas ciclasas.

En la tabla 1 se enumeraban unos pocos ejemplos de diferentes sistemas adenilatos ciclasas estudiados en diferentes tejidos y activables por diversas hormonas. Esta diversidad sigue siendo un hecho si ahora nos trasladamos a los muchos efectos variados y conocidos del AMPc. En la tabla 2 se exponen unos pocos de entre los citados en la bibliografía y que están más sólidamente establecidos.

TABLA 2. ALGUNOS EFECTOS CONOCIDOS DEL AMP cíclico

- Activación de protein quinasas.
- Activación de fosforilasa.
- Inhibición de ciertos enzimas hepáticos.
- Inhibición de glucógeno sintetasa.
- Estimulación de neoglucogénesis.
- Estimulación de cetogénesis.
- Estimulación de incorporación de aminoácidos.
- Estimulación de lipólisis.
- Inhibición de lipogénesis.
- Aumento de permeabilidad al agua y electrolitos.
- Estimulación de esteroidogénesis.
- Mantenimiento de la suficiencia adrenal.
- Estimulación de exocitosis conducente a la liberación de varias hormonas y factores.
- Inhibición de crecimiento celular.
- Incremento de la fuerza de contracción del músculo cardíaco.
- Relajación en musculatura lisa.
- Inhibición de agregación plaquetaria.
- Inhibición en células del Purkinje del cerebelo.

7. EL SISTEMA FOSFODIESTERASA.

Butcher y Sutherland (12) observaron la existencia de un sistema enzimático, la fosfodiesterasa del AMPc, que en presencia de iones Mg^{+2} , produce la ruptura específica hidrolítica (Figura 5) del enlace ester en 3' de la ribosa del AMPc, haciéndose evidente que las metilxantinas tales como cafeína, aminofilina y teofilina, inhiben esa acción enzimática, por lo cual producen un incremento en la concentración del nucleótido cíclico y consiguen acciones metabólicas similares a las obtenidas por la acción hormonal de sustancias tales como la adrenalina, activadora de adenilciclase.

La fosfodiesterasa se encuentra presente en todos los tejidos en los que se evidencia la acción de la adenilato ciclase, y la enzima puede estar preferentemente ligada a membranas como en cerebro, en que lo está en un 70%, pero lo normal es la presencia simultánea de formas particuladas y solubles, como sucede en hígado (12). Se piensa que la fosfodiesterasa es una enzima que actúa continuamente y cuya misión es evitar la acumulación del AMPc que, también de un modo continuo, se va sintetizando. Por ello, son de gran importancia las posibles regulaciones de la enzima por los siguientes mecanismos: a) inhibición por metilxantinas; b) posibilidades de activación de la enzima en presencia de insulina; c) control, gracias a variaciones de las concentraciones fisiológicas de calcio.

Fosfodiesterasa posee un peso molecular variable entre 130.000 y 750.000 daltons, según cual sea el origen de la preparación y parece estar compuesta de subunidades, pudiendo existir en varias formas múltiples o isoenzimas. La mayoría de las células poseen, al menos, dos fosfodiesterasas, una con una constante de Michaelis, K_M , baja para el AMPc ($10^{-6}M$) y otra forma soluble con una K_M más alta ($10^{-4}M$), pensándose que la forma particulada de K_M menor es probablemente la más importante desde el punto de vista fisiológico, ya que los niveles intracelulares del nucleótido cíclico están inversamente relacionadas con la actividad presente en esa forma. Por otra parte, hay indicaciones de que existen mecanismos de interconversión entre las formas de la enzima, lo que sería un excelente sistema de control "in vivo". Más aún, se ha demostrado la existencia de activadores intracelulares naturales así como la de inhibidores y actualmente está establecido que algunas hormonas ejercen efecto directo sobre la forma particulada de la fosfodiesterasa, todo lo cual nos da una imagen de la gran posibilidad de controles

(12) R. W. Butcher y E. W. Sutherland; J. Biol. Chem., 237, 1244, 1962.

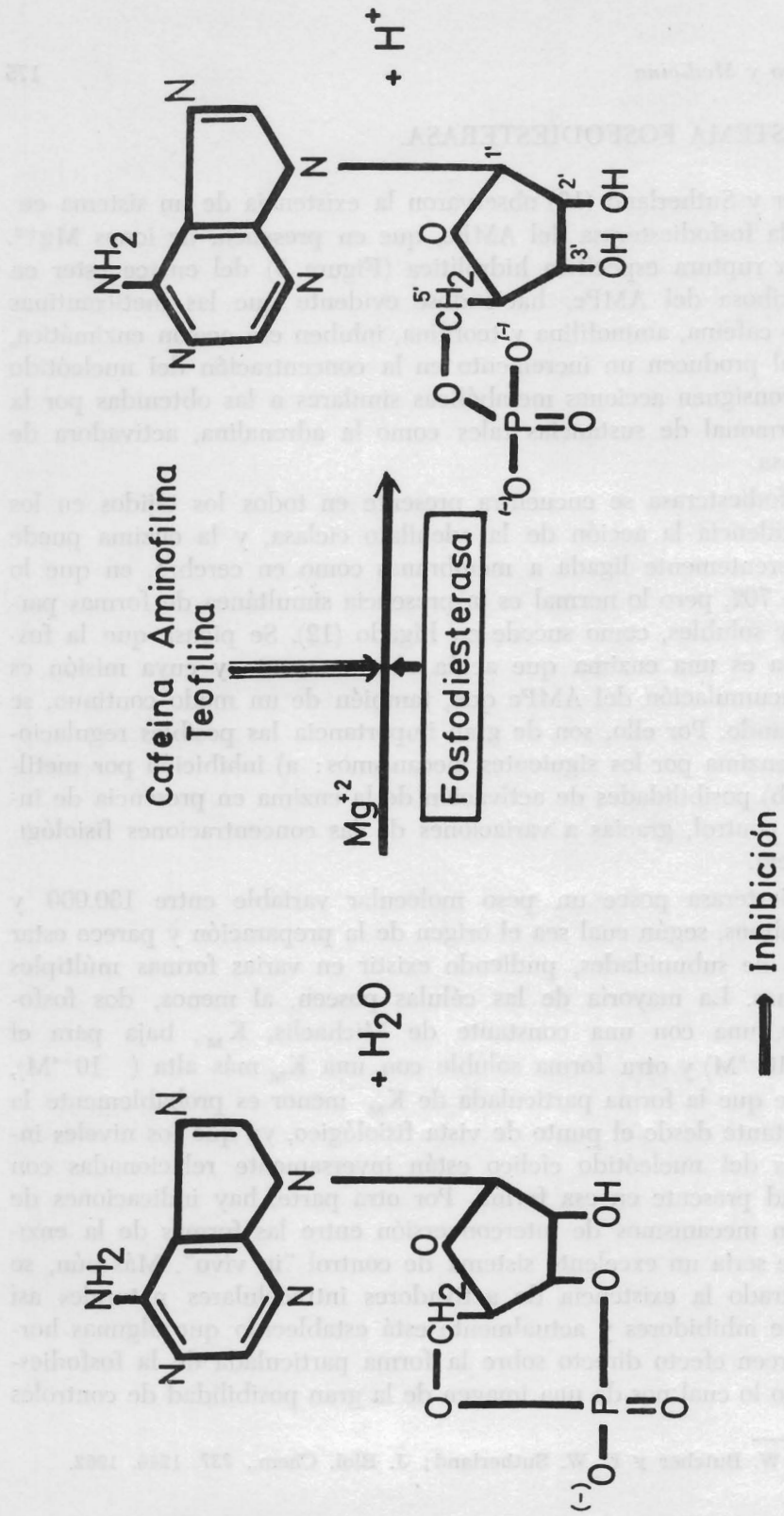


FIGURA 5. Acción de la fosfodiesterasa del AMPc

complejos posibles. Así, la enzima se activa por histamina y se inhibe por p-cloromercuribenzoato, mercapto etanol (lo que señala su naturaleza sulfhidrónica), ATP, otros nucleótidos, pirofosfato, derivados de fenotiazina y de benzotiazina, así como por glucocorticoides y triyodotironina, todo lo cual puede tener en el futuro una gran trascendencia farmacológica. "In vivo", la fosfodiesterasa está sometida a un efecto estimulante de un cierto "cofactor proteínico" distribuido en los tejidos de un modo paralelo a la fosfodiesterasa y sin especificidad de órgano, de modo que el aislado de un tejido determinado puede producir la estimulación de la enzima purificada de cualquier otro tejido. (13).

8. ACCIONES BIOQUIMICAS Y FISIOLÓGICAS DEL AMPc.

Previamente hemos indicado que las acciones del AMPc pueden ejercerse a varios niveles y en este apartado nos proponemos sólo citar algunos de los ejemplos más significativos buscando, siempre que sea posible la explicación a nivel molecular, bioquímico. Aun cuando no exista un sólo esquema unificador, en la Figura 6, se hace un intento de generalización del proceso.

8.1. Efecto sobre la actividad de enzimas

8.1.1. *Protein quinasas*. La acción primaria del AMPc se efectúa a nivel de la activación de protein quinasas (PK), de modo que se puede afirmar que casi todas las acciones conocidas del AMPc se deben a la estimulación de sistemas protein quinasas por este nucleótido (14).

La presencia de protein quinasas es tan universal como la del AMPc, hallándose presente en tejidos de vertebrados, invertebrados y en plantas y microorganismos. Más aún, su papel está íntimamente conectado a las diversas acciones hormonales que participan en glucogenolisis, lipolisis, esteroidogénesis, etc., aparte de que las protein quinasas catalizan fosforilaciones de diversas sustancias tales como histonas, protaminas, caseína, albúmina de suero, etc.

Walsh propuso, entre 1970-1973 (15-19), un esquema de protein qui-

(13) W. Y. Cheung y L. Salganicoff; Fed. Proc., 25, 714, 1966.

(14) D. A. Walsh, J. P. Perkins y E. G. Krebs; J. Biol. Chem. 243, 3763, 1968.

(15) M. A. Brostrom, E. M. Reimann, D. A. Walsh y E. G. Krebs; Adv. Enzyme Reg., 8, 191, 1970.

(16) C. D. Ashby y D. A. Walsh; J. Biol. Chem. 277, 6637, 1972.

(17) C. D. Ashby y D. A. Walsh; J. Biol. Chem., 248, 1255, 1973.

(18) D. A. Walsh, C. D. Ashby, C. Gonzales, E. H. Calkins y E. G. Krebs; J. Biol. Chem. 246, 1977, 1971.

(19) D. A. Walsh y C. D. Ashby; Recent. Prog. Horm. Res., 29, 329, 1973.

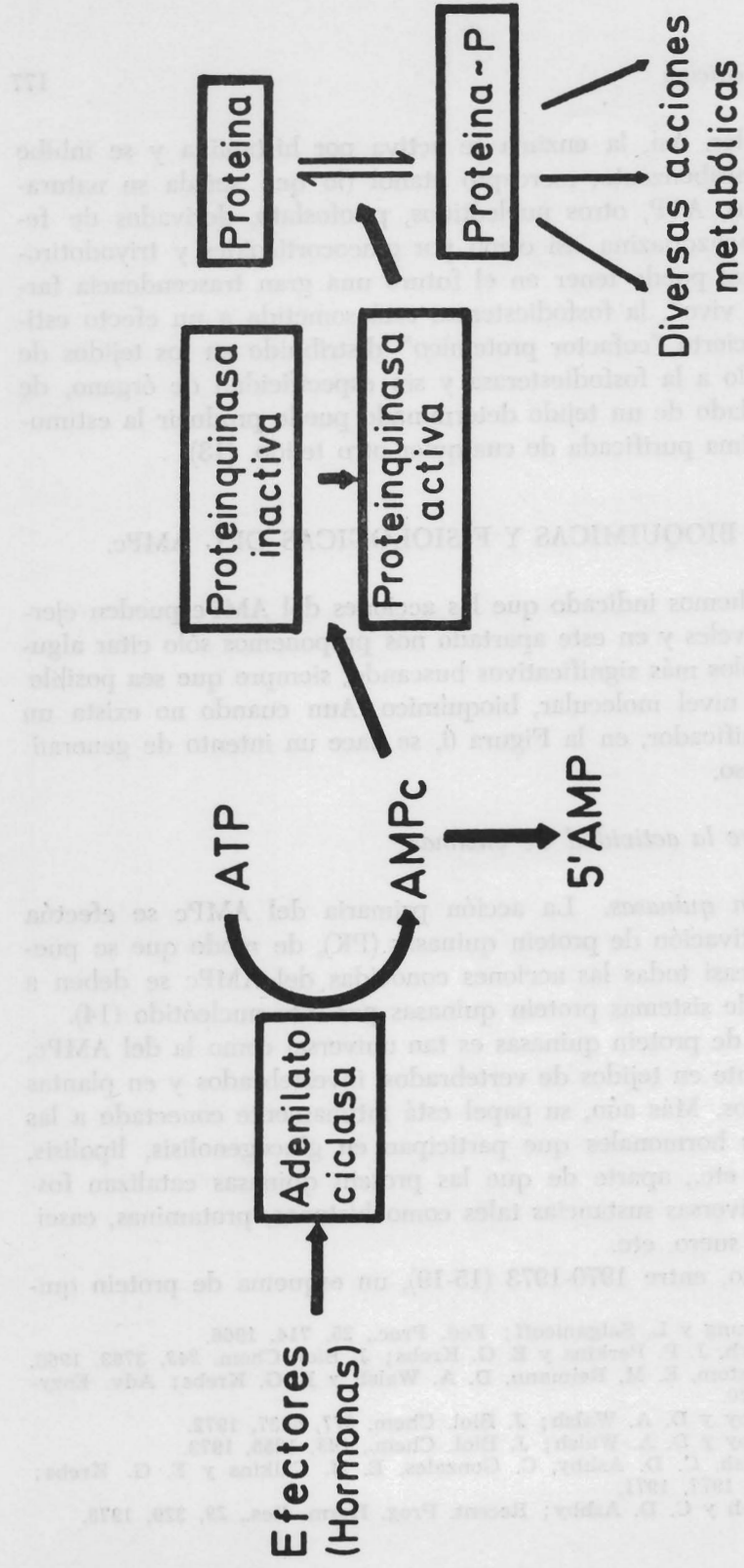


FIGURA 6. Actuación del AMPc

(129) W. F. Crone y J. E. Crone; *Exp. Cell Res.* 1962, 23, 370-375.
 (130) H. A. Walsh, J. E. Crone y E. G. Krebs; *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 1025-1030.
 (131) M. A. Strydom, E. M. Nelson, D. A. Walsh, J. E. Crone y E. G. Krebs; *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 1031-1035.
 (132) C. D. Ashby y E. A. Walsh; *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 1036-1040.
 (133) C. D. Ashby y E. A. Walsh; *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 1041-1045.
 (134) D. A. Walsh, C. D. Ashby, C. Craven y E. G. Krebs; *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 1011-1015.
 (135) D. A. Walsh y C. D. Ashby; *Biochem. Physiol.* 1970, 1, 129-137.

nasa que se basa en la existencia de dos subunidades proteínicas en la enzima, con una de ellas catalítica (C) y con otra subunidad reguladora (R) termostable e inhibidora al formar un complejo inactivo con la subunidad catalítica. El contenido de proteína inhibidora es alto en tejidos como cerebro, corazón y músculo, habiéndose demostrado por ejemplo, que en corazón de rata la concentración del inhibidor varía según las condiciones fisiológicas, disminuyendo en ayunas y aumentando tras la alimentación.

La situación se resume en la Figura 7, donde se observa que el holoenzima formado por el complejo de las dos subunidades es inactivo, (poseyendo un radio de Stokes de 40 Å), y la presencia de AMPc produce un cambio conformacional junto a la disociación del complejo, obteniéndose una subunidad activa C (de 25 Å), mientras que la subunidad R (35 Å), permanece unida al AMPc, tras otro cambio de conformación.

Existen datos que permiten afirmar que también las histonas, en ausencia del AMPc, favorecen esa disociación-activación (20), mientras que por el contrario muchas de las acciones fisiológicas de la insulina, tales como su efecto antilipolítico y el glucogenosintético, se podrían explicar por el hecho de que esta hormona parece favorecer el proceso de asociación-inactivación, contrarrestando por tanto los efectos del AMPc. En todo caso, aunque pueden existir diversas proteinquinasas, es la misma enzima la que controla la glucogenosíntesis y la glucogenolisis.

8.1.2. *Glucógeno fosforilasa.* Este sistema ha sido el más estudiado y por ello es el ejemplo típico de un mecanismo de amplificación como se puede observar en la Figura 8. Ya Krebs había observado, junto con Fischer, que existían formas activa e inactiva de la enzima fosforilasa de músculo, responsable directa de la glucogenolisis al transformar el glucógeno en GIP. Como ya se ha señalado, en 1968 se pudo establecer el papel del AMPc en la activación de la enzima, al enlazarse el nucleótido con otra enzima, una proteína quinasa, que es inactiva si el AMPc no está presente. La quinasa activada realiza la misma función activadora hacia otra enzima relacionada, una fosforilasa quinasa, que a su vez puede activar la fosforilasa "b" hasta la forma activa "a", por lo que el resultado de la activación final es la rotura del glucógeno hasta glucosa 1P. En las células hepáticas la situación es muy semejante y sólo varían algunos condicionamientos de los sistemas enzimáticos. Estos sistemas en cascada producen un gran efecto multiplicador y se puede calcular que la aparición y acción de un micromol de la hormona activa-

(20) E. Miyamoto, G. L. Petzold, J. F. Kuo y P. Greengard; J. Biol. Chem., 248, 179, 1973.

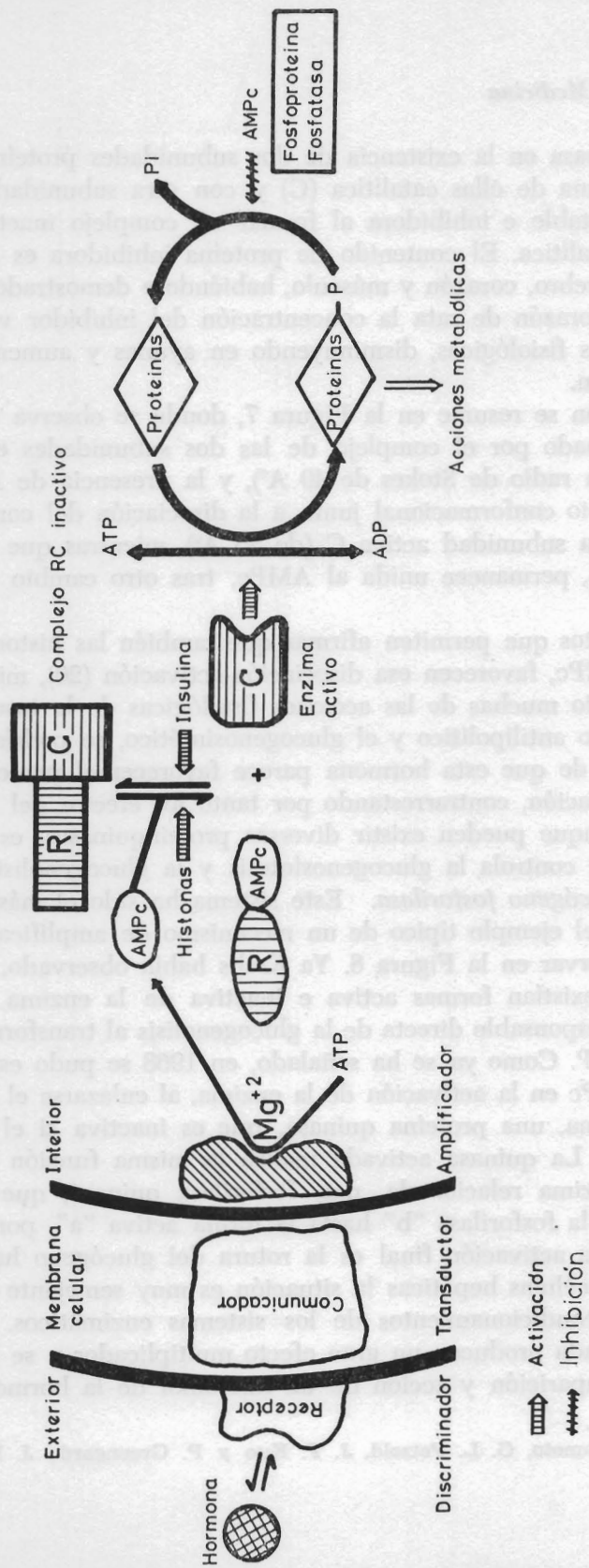


FIGURA 7. Actuación de proteinquinasas

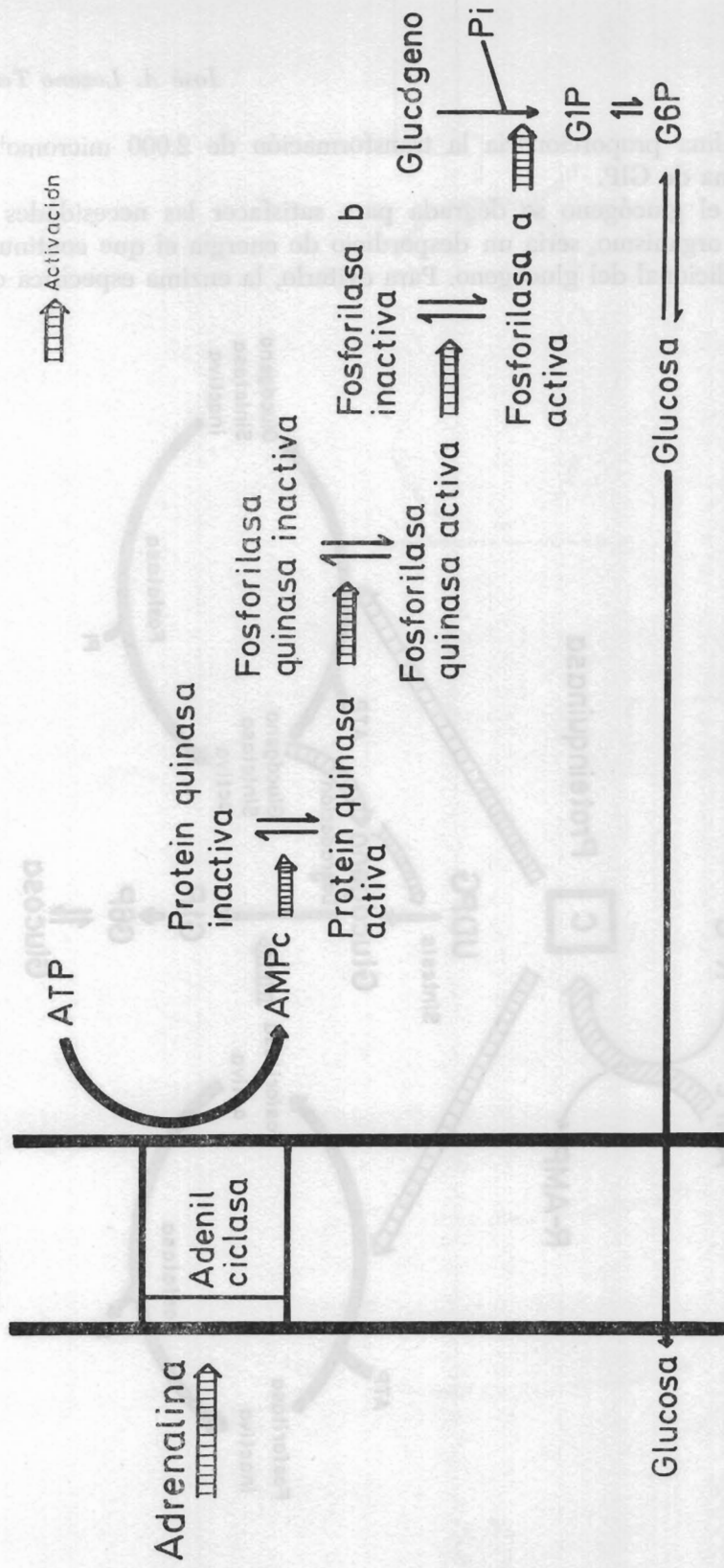


FIGURA 8. Mecanismo de la fosforilasa y liberación hepática de glucosa a sangre, mediado por el AMPc.

dora adrenalina proporcionaría la transformación de 2.000 micromoles/min. en forma de GIP.

Cuando el glucógeno se degrada para satisfacer las necesidades de glucosa del organismo, sería un desperdicio de energía el que continuase la síntesis adicional del glucógeno. Para evitarlo, la enzima específica que

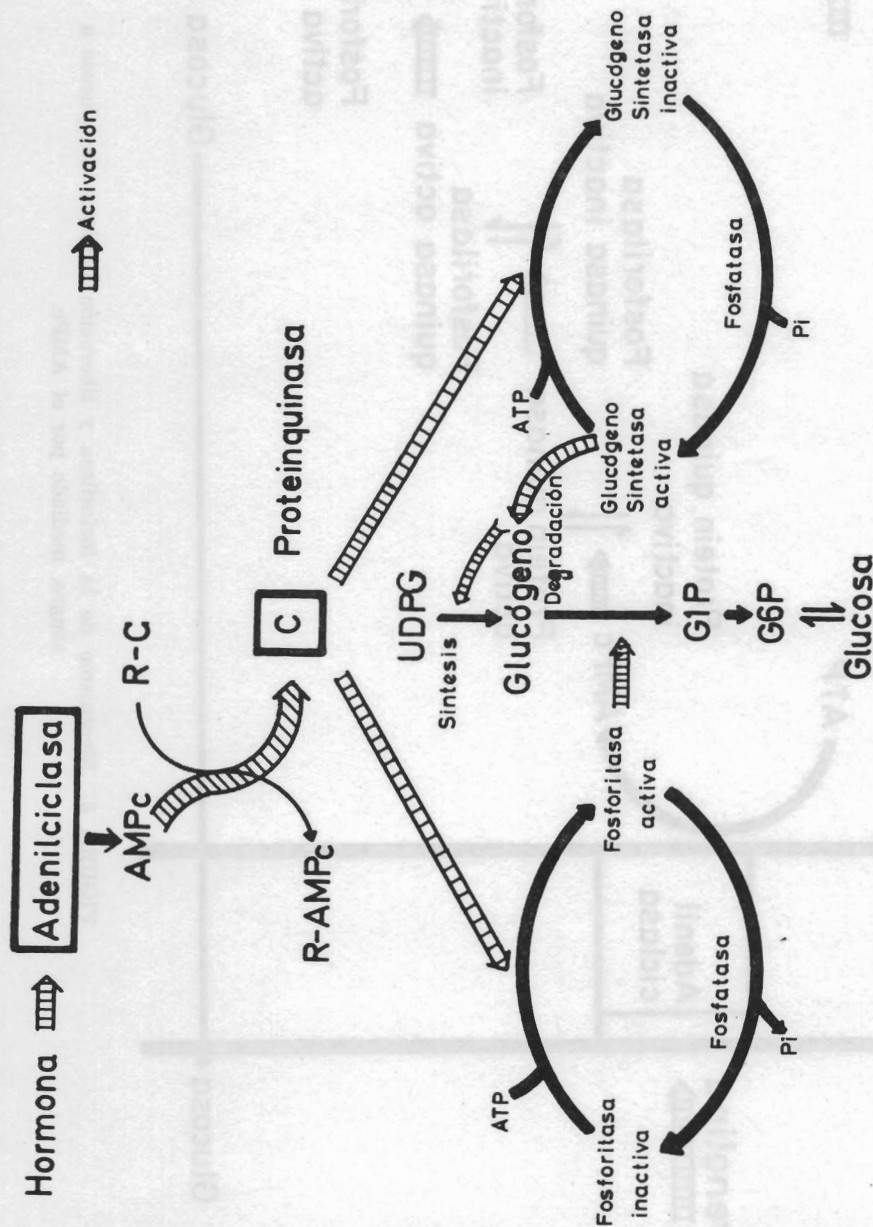


FIGURA 9. Mecanismo de acción de proteínaquinasa en el metabolismo

media la síntesis de glucógeno, la glucógeno sintetasa, también puede estar en forma activa e inactiva y a través de otro sistema en cascada (Figura 9), la presencia de AMPc en este caso inactiva la glucógeno sintetasa, impidiendo la biosíntesis del glucógeno.

8.1.3. *AMP cíclico y lipólisis.* El AMPc a través de la correspondiente proteína quinasa es la sustancia responsable de la activación de la lipasa sensible hormonalmente la que, tras su paso desde la forma inactiva hasta la activa, consigue catalizar la hidrólisis de la grasa del tejido adiposo hasta ácidos grasos libres y glicerina. Numerosas sustancias diferentes, entre ellas al menos 7 hormonas, pueden controlar el proceso a diversos niveles y en la Figura 10 se intenta resumir las posibilidades de estos diferentes controles, desde las diferentes hormonas, que poseen receptores específicos sobre las membranas de los adipocitos capaces de estimular la adenilciclase, pasando por otras sustancias cuya acción también se realiza al nivel de la ciclase, o por otras diferentes como cafeína y teofilina que inhiben la fosfodiesterasa, así como otras que pueden alterar la velocidad de la fosforilación oxidativa.

8.1.4. *AMP cíclico y esteroidogénesis.* La estimulación comprobada de la esteroidogénesis en corteza suprarrenal o en cuerpo lúteo por la acción hormonal mediada por el AMPc se podría realizar básicamente por la existencia de una mayor concentración de G6P disponible lo que favorece la vía de las pentosas-fosfato, productora de grandes cantidades de NADPH + H⁺ que son necesarios para la síntesis del colesterol. En la Figura 11 se expone un esquema simplificado del proceso. Sin embargo, la situación real es más compleja y el AMPc podría estimular al menos 3 etapas diferentes de la biosíntesis de esteroides tal como se resume en la Figura 12: a) Paso desde ester de colesterol a colesterol; b) Transformación de colesterol a pregnenolona; c) Conversión de 11-deoxicorticosterona a corticosterona.

8.2. AMPc y glucocorticoides.

Aunque el efecto fisiológico de las hormonas esteroides no parece estar mediado por el esquema del segundo mensajero, sin embargo los glucocorticoides adrenales están implicados en el control de muchos procesos metabólicos en los que interviene el AMPc. Ello se debe a que los glucocorticoides actúan a nivel de estímulo de síntesis de diversas proteínas, incluyendo posiblemente componentes de proteínfosfoquinasas y a elementos reguladores de la adenilato ciclase membranosa, por todo lo cual el efecto sería aumentar tanto la propia concentración de AMPc como las proteínas que interactúan con el AMPc.

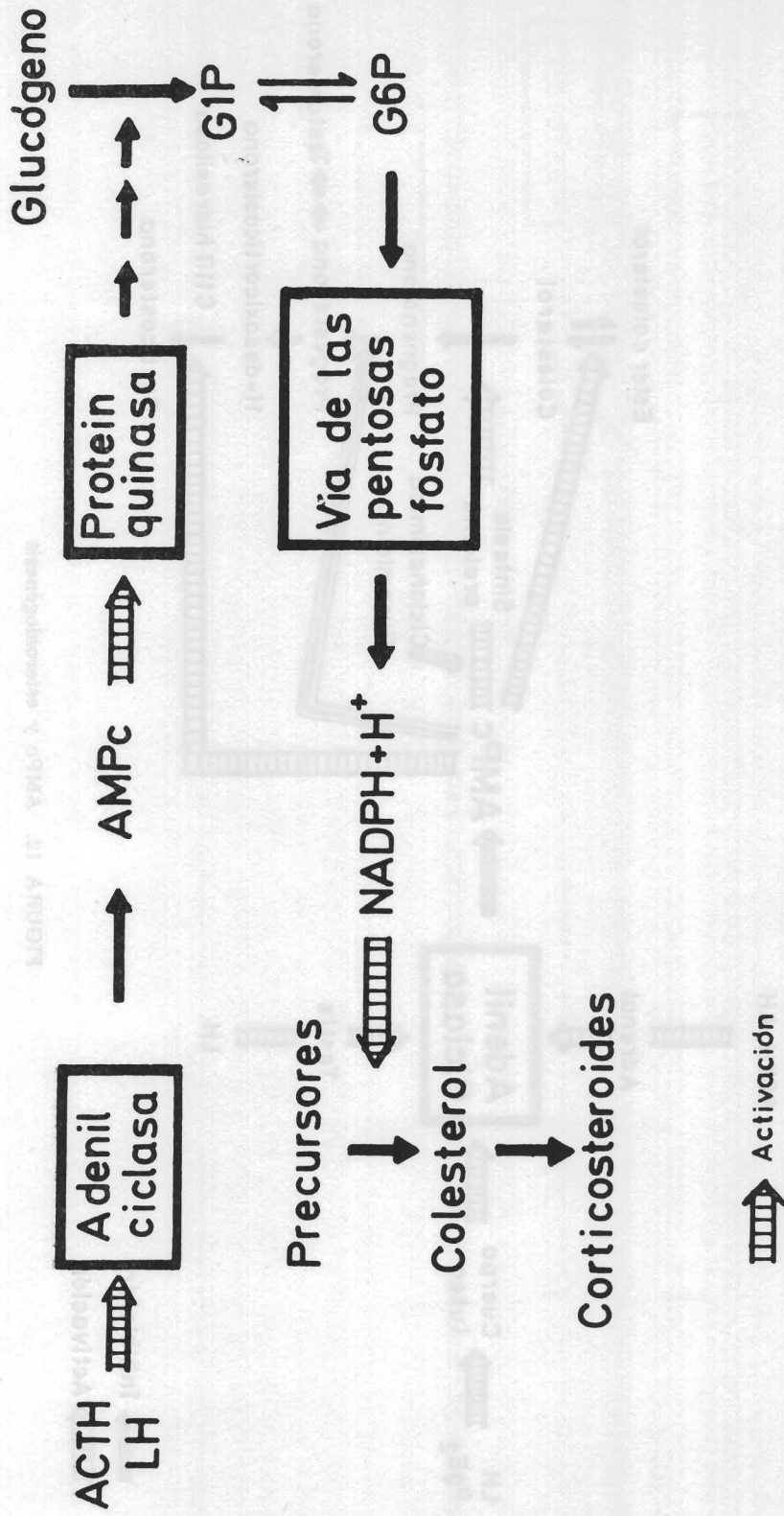


FIGURA 11. AMPc y esteroidogénesis

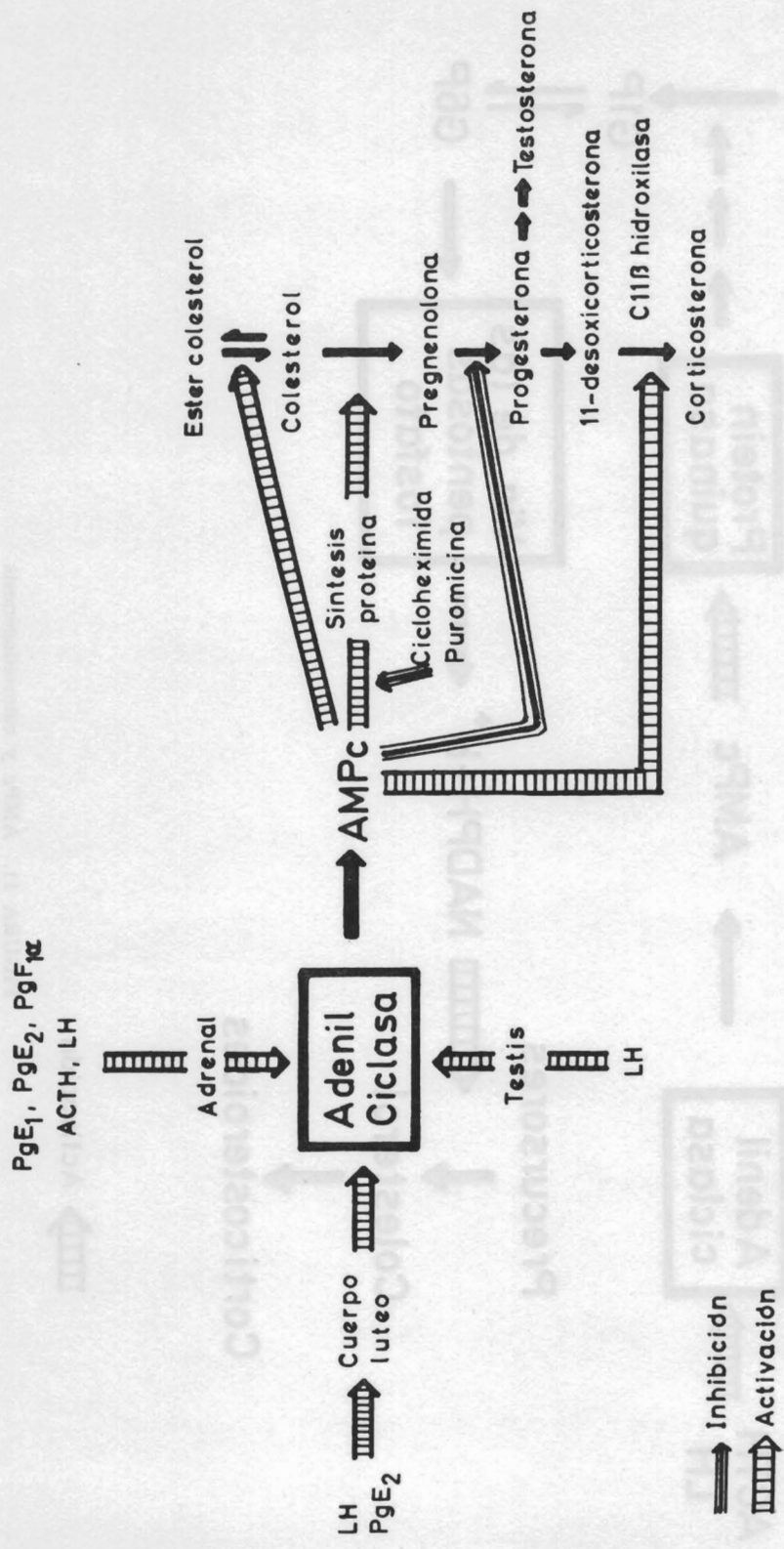


FIGURA 12. AMPC y esteroidogénesis

8.3. AMPc y prostaglandinas

Las prostaglandinas son otro grupo de hormonas con un amplio espectro de acciones fisiológicas y con una estrecha relación con el sistema adenilato ciclasa. Sin embargo no hay un esquema general válido para todas las clases de prostaglandinas y los diversos tipos de tejidos. En la mayoría de las ocasiones estimulan la síntesis de AMPc, pero en casos aislados actúan inhibiendo. Por otra parte, también parece que pueden inhibir la acción de fosfodiesterasa y a su vez el AMPc puede estimular la síntesis de prostaglandinas.

8.4. AMPc y síntesis de proteínas.

8.4.1. *Transcripción de genes.* El AMPc puede estimular la síntesis de ciertas proteínas específicas. Así en cultivos de "E. coli" se ha comprobado la existencia de una proteína receptora del AMPc, denominada también proteína de activación de genes, que se ha purificado y cuya función es la de enlazarse específicamente al AMPc. El complejo así formado se une al ADN en lugares específicos al comienzo de los lugares de control genético que se conocen con el nombre de "Operones", descubiertos por Jacob y Monod hace unos 15 años. Como consecuencia de ello, la ARN polimerasa dependiente de ADN se puede enlazar en el lugar específico denominado "promotor" y actúa transcribiendo la información genética, cosa que no ocurrirá en ausencia del AMPc. Para que un sistema de control de este tipo pueda ser efectivo es necesario evitar simultáneamente la presencia de las proteínas denominadas "repressoras" que se fijan en los lugares "operadores" situados también al principio del sistema "Operón", con lo cual se consigue inducir la síntesis de las enzimas llamadas inducibles. En la Figura 13 se muestra la necesidad de la actuación de la proteína receptora del AMPc (PRA) con el AMPc a fin de que pueda actuar la ARN polimerasa. El control que ejercita el AMPc sobre esta transcripción de ciertos genes puede ser la causa inmediata de las conocidas acciones hormonales induciendo la síntesis de ciertas enzimas, limitándose las hormonas a controlar la cantidad del AMPc celular.

Por otra parte, en el control de la actividad genética de las células de los organismos eucarióticos hay evidencias de que un fuerte protagonismo lo ejercen las proteínas cromosómicas de tipo básico que conocemos con el nombre de histonas, así como otras proteínas de tipo no histona y también asociadas con la cromatina. La situación normal es la de que las histonas a pH fisiológico poseen gran número de cargas positivas

en sus grupos ionizables, por lo que ejercen fuertes acciones de tipo electrostático sobre las moléculas de ADN, cargadas negativamente. Esta asociación ADN-histona, evita que actúe la ARN polimerasa y que se realice la transcripción genética. Una proteína no-histona específica entre las muchas existentes, puede fosforilizarse mediante una proteína-quinasa y al cargarse negativamente con los grupos fosfatos, sufre simultáneamente un efecto de atracción hacia una porción de las histonas y un efecto repulsivo en relación con el ADN. Como consecuencia de ello, se produce una asociación entre las dos proteínas y el complejo se separa de la zona de ADN que estaba protegida, con lo que al quedar libre esta

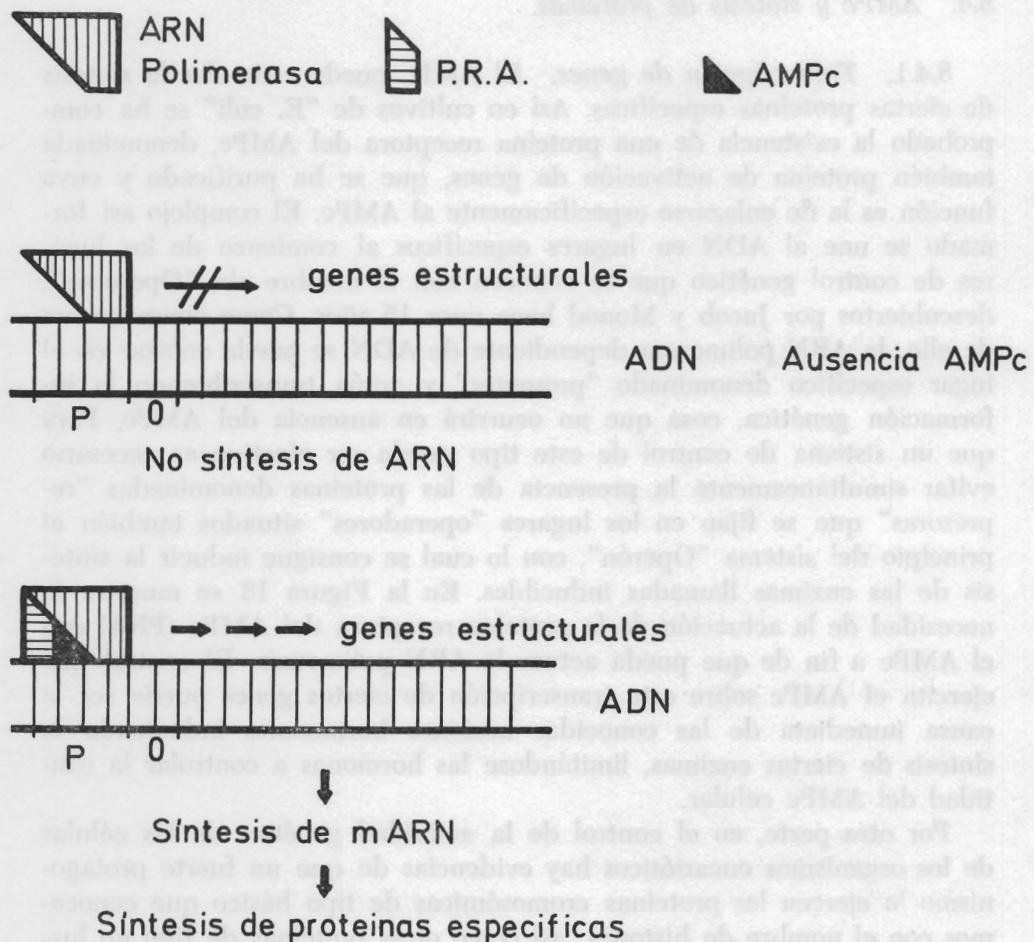


FIGURA 13. Papel de la P.R.A. en el modelo Operón de control genético de síntesis de proteínas.

región de ADN, puede realizarse la transcripción en forma de ARN (21). No podemos olvidar en este punto que el papel de las hormonas y del AMPc en la regulación de muchos procesos metabólicos, por extrapolación podría aplicarse a la regulación de la transcripción genética.

Si este modelo de regulación se confirma en el futuro, podría llevarnos al aislamiento de proteínas específicas que regulan la expresión de genes determinados (22), lo cual tendría como consecuencia la posibilidad de insertar estas proteínas dentro de las células para modificar las anomalías de la transcripción genética.

Investigaciones recientes parecen indicar efectivamente que la histona F₁ se une selectivamente a ciertas regiones de ADN y que unas moléculas de histonas se asocian con otras bastante específicamente (23).

Un modelo sofisticado de regulación genética en células de mamíferos se ha publicado recientemente (24). Las moléculas de esteroides regularían la síntesis de una proteína integradora, de carácter no-histona, pero nuclear. El papel del AMPc sería estimular su conversión en una forma fosforilada que enlazaría al lugar "promotor" de los genes estructurales, permitiendo con ello que la ARN polimerasa inicie la transcripción.

En todo caso, se ha señalado la existencia de al menos 25 proteínas diferentes (25) cuya síntesis está controlada por el AMPc.

8.4.2. *Traducción del ARN-m.* Hormonas como ACTH ejercen grandes efectos sobre el tamaño y peso de los tejidos receptores, tal como adrenales. En respuesta a la ACTH se sabe que se estimula la síntesis del AMPc y que se ocasiona la fosforilación de una proteína ribosómica, que regula el proceso de traducción del mensaje genético (en presencia simultánea de GTP) desde el ARN mensajero hasta la proteína correspondiente.

8.5. AMPc y permeabilidad de las membranas.

El AMPc (o las hormonas que aumentan su tasa, tal como la vasopresina) incrementa la permeabilidad de ciertas membranas epiteliales hacia el agua, sodio y otras moléculas de bajo peso molecular, tales como la urea. Efectos de este tipo se comprobaron en principio en vejiga urinaria de sapo (26) y posteriormente se han confirmado en otros teji-

(21) Chromosomal proteins and their role in the regulation of gene expression. Eds. G. Stein, J. S. Stein y L. K. Kleinsmith, Academic Press, 1975.

(22) G. Stein, J. S. Stein y L. K. Kleinsmith; *Scient. Amer.*, 232, 47, 1975.

(23) S. B. Kolata; *Science*, 188, 1097, 1975.

(24) J. P. Jost y M. Averner; *J. theor. Biol.*, 49, 337, 1975.

(25) H. V. Rickenberg; *Ann. Rev. Microbiol.*, 28, 353, 1974.

(26) J. Osloff, J. S. Handler; *Ann. J. Med.*, 42, 757, 1967.

dos animales y, como indicamos más adelante, han dado una explicación racional a las diarreas producidas en los procesos coléricos.

8.6. *Hambre y la teleología del AMPc.*

En seres vivos tan dispares como hongos, bacterias como *E. coli*, peces, mamíferos y humanos, es importante el hecho de que la respuesta a una disminución en el suministro de glucosa es siempre la misma; un aumento en la síntesis del AMPc. En el caso de las bacterias, la presencia de glucosa disminuye la síntesis del AMPc y se bloquea la transcripción del Operón lactosa, mientras que en ausencia de glucosa, la transcripción de ese Operón hace que se utilicen sustratos alternativos.

En ciertas formas elementales de vida, la deficiencia en glucosa conduce a un aumento en su nivel de AMPc, lo que ayuda a su intento de búsqueda de nuevas fuentes de alimentos. Si no se consiguen estos, el AMPc hace que, por ejemplo, las amebas libres se agreguen hasta formas multicelulares esporulantes lo que les permite sobrevivir durante el período de privación de glucosa (27). En el hombre, la deficiencia en glucosa produce el estímulo de la ciclase hepática por el glucagón, y el AMP cíclico incrementa la glucogenolisis y neoglucogénesis como mecanismos compensadores.

Esta similitud en especies tan diversas indica un papel importante para este nucleótido cíclico en los procesos filogenéticos y ontogénicos (28) e incluso la universalidad del AMPc como respuesta al hambre sugiere su presencia en las formas autorreplicativas más primitivas al comienzo del proceso evolutivo que ha conducido hasta el hombre.

8.7. *AMPc y morfogénesis.*

En la actualidad está claramente establecida una relación entre el AMPc y los efectos morfogenéticos. En "*Dictyostelium discoideum*" las células son muy sensibles a sus propias señales quimiotácticas y morfogenéticas del AMPc (29) y poseen receptores específicos. Las células por su parte sintetizan y excretan pulsos del AMPc en respuesta a las señales. Se podrían citar otros ejemplos, como en bacterias coliformes en que el AMPc es esencial para la formación de flagelos (30).

(27) T. M. Konijn, D. Barkley, Y. Y. Chang y J. Bonner; *Ann. Nat.*, 102, 225, 1968.

(28) M. A. Bitensky, R. E. Gorman; *An. Rev. Mecic.*, 23, 263, 1972.

(29) J. D. Gross; *Science*, 255, 522, 1975.

(30) T. Yokota, J. S. Gots.; *J. Bacteriol.*, 103, 513, 1970.

La participación del AMPc en los procesos del desarrollo podría resumirse, según Daniel McMahon (31) del siguiente modo:

- 1.— Existen sustancias inductoras que regulan las concentraciones de los nucleótidos cíclicos y de ciertos iones en las células. Entre ellas se incluyen neurotransmisores, hormonas polipépticas, colágeno, proteínas tipo lectinas y prostaglandinas.
- 2.— Los inductores se enlazan a receptores situados en las membranas plasmáticas, existiendo un amplio espectro de receptores y un gran repertorio celular de posibles respuestas, que pueden depender de la diferenciación celular previa.
- 3.— Los inductores, al controlar las concentraciones de AMPc e iones inorgánicos en la célula, señalan las vías a seguir en el desarrollo celular mediante la regulación del metabolismo y de la expresión de los genes en las células en desarrollo.

Este esquema de trabajo posee el atractivo de que sean derivados sencillos de metabolitos, incluyendo neurotransmisores y nucleótidos cíclicos, los que funcionen como moléculas reguladoras en eucarióticos. Los neurotransmisores a lo largo de la evolución, habrían pasado de ser primeramente mensajeros intracelulares hasta obtener el papel de mensajeros intercelulares en los procesos relativamente lentos de la comunicación de la información del desarrollo. El proceso evolutivo habría progresado finalmente hasta llegar a su participación en la rápida comunicación intercelular mediada por los nervios.

La evolución de los niveles de AMPc en el crecimiento y desarrollo normal podría resumirse en el sentido de que tras la fertilización (Figura 14) la concentración en AMPc baja más o menos rápidamente, permitiendo que tenga lugar al principio de la embriogénesis una división celular rápida, ya que existe una relación inversa entre niveles de AMPc y velocidad de crecimiento celular (32). En esta situación, como las células normales poseen un mecanismo por medio del cual el contacto célula-célula conduce a un estímulo de la actividad ciclasa, cuando comienza a operar el mecanismo responsable de la inhibición por contacto ello significaría una mayor concentración de AMPc (línea I). Con el tiempo, se irán desarrollando los receptores hormonales así como otros mecanismos de excitación de adenilato ciclasa, lo que conduce a niveles superiores de AMPc (línea II). Este nucleótido juega entonces su conocido papel regulador de células altamente diferenciadas, disminuyendo por tanto la velocidad de crecimiento celular y consiguiendo una multitud de efectos complejos a través de los mecanismos bioquímicos de control

(31) D. McMahon: *Science*, 185, 1.012, 1974.

(32) M. L. Heidrick y W. L. Ryan; *Cancer Res.*, 31, 1313, 1971.

de actividades enzimáticas y de regulación genética de la biosíntesis proteica.

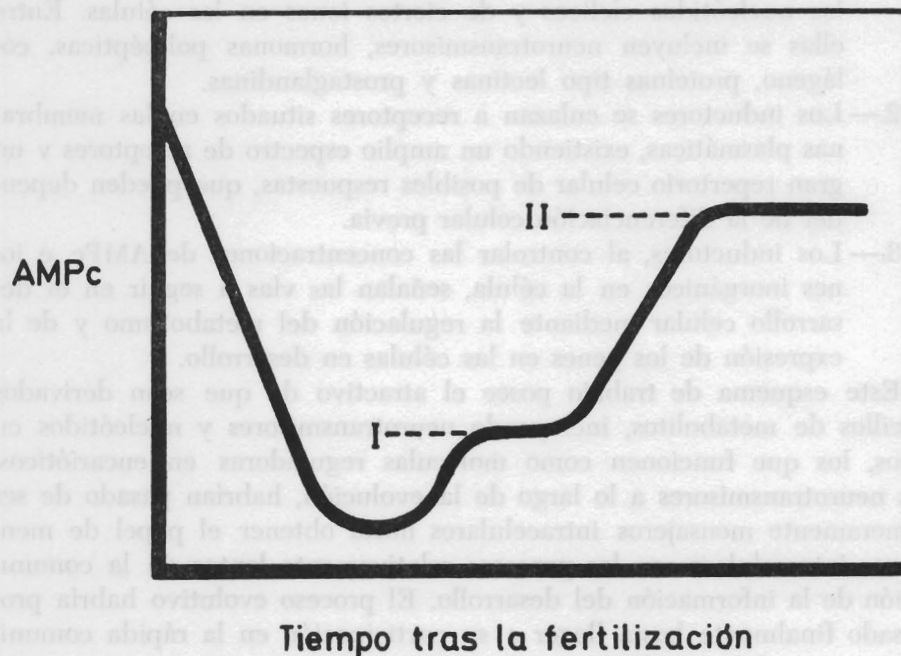


FIGURA 14. AMPc y desarrollo

8.8. AMPc y sistema nervioso.

Los niveles de adenilciclase, fosfodiesterasa y proteinquinasas, son especialmente altos en los tejidos nerviosos y se han realizado numerosas investigaciones que apoyan la idea de que la síntesis transináptica del AMPc puede ser el mecanismo que permite la transformación de la actividad eléctrica presináptica hasta las modificaciones macromoleculares postsinápticas.

La síntesis del AMPc en los tejidos nerviosos está regulada por distintos agentes neurohumorales y el papel del nucleótido puede ser diverso: a) a nivel presináptico, aumentando no la amplitud, sino la frecuencia de los potenciales miniatura de las placas terminales; b) a nivel postsináptico produciendo una hiperpolarización lenta de las células de Purkinje y de las neuronas de los ganglios superiores cervicales; c) control de los cambios de conductancia de las membranas mediante la actuación de proteinquinasas, que podrían participar en procesos complejos como los mecanismos moleculares de adquisición de conocimientos.

Por otra parte, se ha comprobado la existencia de conexión entre los procesos que dañan el sistema nervioso central o la hiperfunción en la región hipotalámica, respecto a los valores del AMPc en el líquido cerebrospinal (33).

En el caso concreto de la dopamina, durante los últimos 10 años ha quedado bien establecida su importancia como neurotransmisor en el cerebro de mamífero y son de importancia clínica las anormalidades de la neurotransmisión dopaminérgica (34) y existe evidencia de que las drogas que se usan para tratar la esquizofrenia, son antagonistas de la dopamina en el cerebro (35). Pues bien, es interesante el hecho de que la activación de los receptores de dopamina en el cerebro está acoplada a un aumento en el AMPc.

Como aplicación de todo ello, existen intentos para correlacionar los mecanismos dependientes del AMPc con la fisiología y la farmacología del Sistema Nervioso Central y se conocen bastante bien los efectos que ejercen sobre el comportamiento la administración de nucleótidos cíclicos por vía intraventricular (36), así como la acción antiansiedad de los inhibidores de fosfodiesterasa administrados parenteralmente (37) aunque la conclusión final en estos aspectos es la necesidad de un mayor y más profundo trabajo que permita establecer los papeles específicos del AMPc la integración del Sistema Nervioso Central.

8.9. AMPc y respuesta inmunológica.

Desde 1972 se admite que el AMPc, actuando como segundo mensajero de hormonas vasoactivas y de ciertos mediadores de la inflamación, modula "in vitro" una gran variedad de procesos inmunológicos en modelos experimentales de hipersensibilidad inmediata y retardada, así como la respuesta humoral de los anticuerpos. En todos los sistemas "in vitro" el AMPc inhibe una acción inmunológica o inflamatoria de una u otra subclase de leucocitos y la producción de nucleótidos se incrementa por acción de catecolaminas beta-adrenérgicas, histamina y prostaglandinas de la serie E.

Los datos experimentales apoyan la hipótesis (38) de que también

(33) V. V. Myllylä, E. R. Heikknen, S. Similä, E. Hokkanen y H. Vapaatalo; *Z. Kinderheilk.*, 118, 259, 1975.

(34) O. Hornykiewicz; *Br. Med. Bull.*, 29, 168, 1973.

(35) S. H. Snyder, S. P. Banerjee, H. I. Yamamura y D. Greenberg; *Science*, 184, 1243, 1974.

(36) G. L. Gassa, G. Krishna, J. Forn, A. Tagliamonte y B. B. Brodie; *Adv. Biochem. Psychopharmac.*, 3, 371, 1971.

(37) B. Beer, M. Chasin, D. E. Clody, J. R. Vogel y Z. P. Horovitz; *Science*, 176, 428, 1972.

(38) H. R. Bourne et al., *Science*, 184, 19, 1974.

"in vivo" ciertas hormonas y mediadores de la inflamación actúan regulando el carácter y la intensidad de las respuestas inflamatorias e inmunológicas gracias a la acción inhibitoria general del AMPc sobre esas respuestas leucocitarias, siendo interesante hacer constar que, por el contrario, el GMPc revierte el efecto inhibitor del AMPc. Como señaló Watson (39) la interacción del antígeno con las células sensibles a él, puede conducir a "inducción" (síntesis de anticuerpo) o "parálisis" (las células no se inducen). Un cociente alto en la relación AMPc/GMPc sería el mediador intracelular de la señal paralítica, mientras que el GMPc, o una baja relación AMPc/GMPc se requeriría como mediador de la señal inductiva (40).

En la Figura 15 se expone un esquema simplificado de la respuesta inmunológica y de los lugares donde podrían actuar los nucleótidos o las hormonas. Tanto los linfocitos dependientes del timo (T) o los independientes (B) se "activan" por contacto con el antígeno para producir tolerancia específica mediada celularmente o por anticuerpos. Los dibujos en forma dentada sobre la superficie de las células efectoras señalan la aparición de receptores hormonales específicos, mientras que los lugares A, B, C, D, E, son aquellos en que existe evidencia experimental de que las hormonas (prostaglandinas, histamina, catacolaminas) o los nucleótidos cíclicos, ejercen efectos al menos "in vitro". Así, A representa la inhibición de la transformación inducida mitogénica o antigénicamente y de la proliferación de linfocitos T; B significa la inhibición de la citólisis específica alogénica de las células diana; C es la inhibición de la producción o liberación de productos solubles linfocitarios tales como el interferón; D es la reversión de la supresión inmunológica inducida por el antígeno en contacto con los linfocitos o bien podría suponer, por ejemplo, la evitación de la aglutinación que se produce normalmente por acción de la toxina del cólera; E podría representar la inhibición de la producción o liberación de anticuerpos a eritrocitos heterólogos.

8.10. AMPc y Melanización.

El melanocito es una célula epidérmica de funciones especializadas que se deriva de la cresta neural y en él tiene lugar el proceso de melanización en el que se podrían distinguir varias fases como: 1) síntesis de melanina; 2) translocación, dentro del melanocito, de los gránulos de pigmento; 3) transferencia del gránulo de pigmento a los queratinocitos; 4) dispersión de melanosoma dentro del queratinocito. En la actualidad

(39) J. Watson, R. Epstein, M. Collin; *Nature*, 246, 405, 1973.

(40) J. Watson; *J. Exptl. Medic.*, 141, 97, 1975.

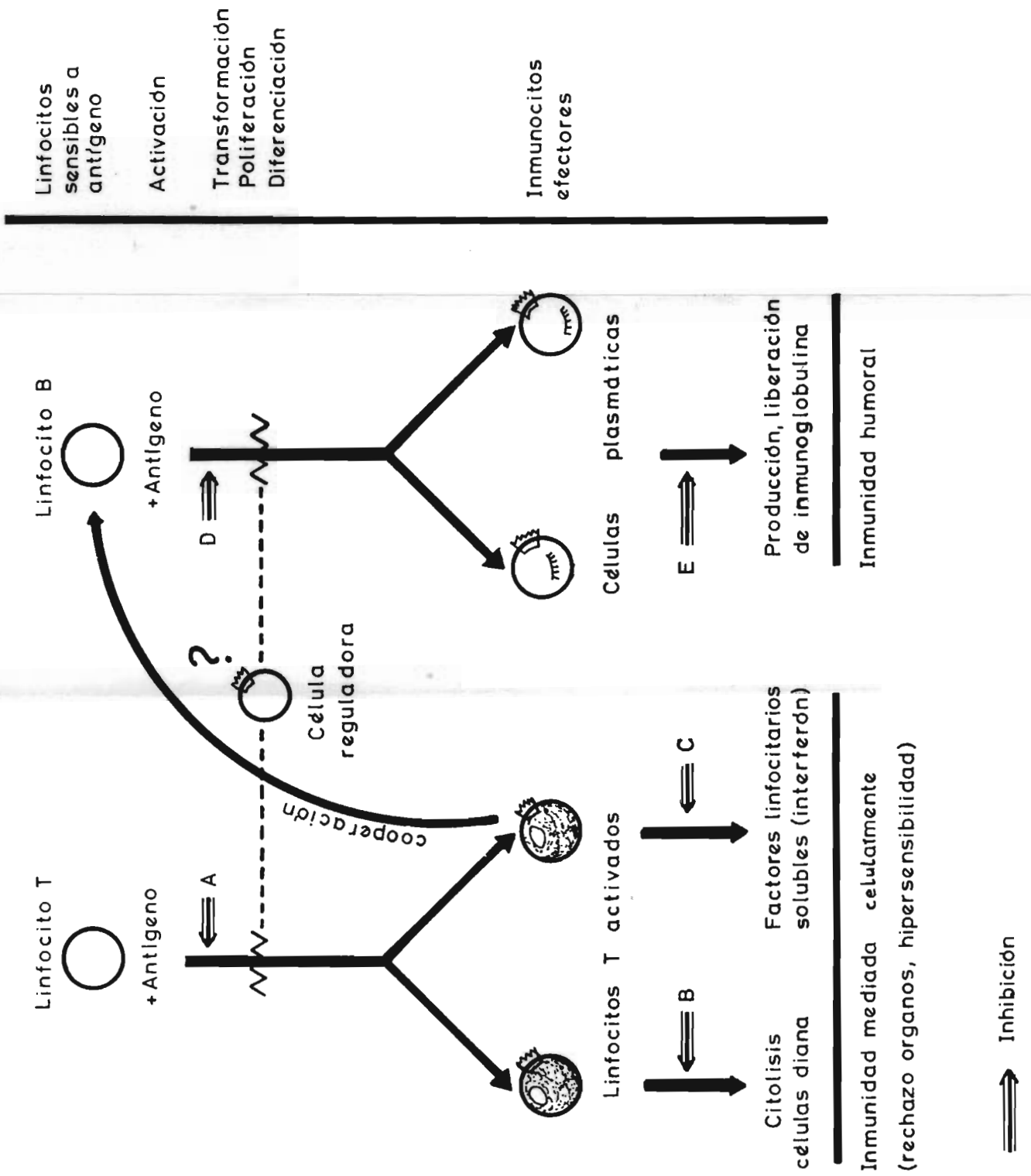


FIGURA 15. Lugares de acción de las hormonas y del AMPc en la regulación de la respuesta inmunológica. Adaptado de (38). Detalles en el texto.

se conocen bastantes detalles de las dos primeras etapas y a ellas nos referimos.

La síntesis de melanina se efectúa en varios pasos de los cuales sólo los dos primeros están catalizados enzimáticamente por un atrayente sistema enzimático tirosinasa que es objeto de estudio en nuestro Departamento. La tirosinasa cataliza la transformación de tirosina a dopa y la de dopa a dopaquinona. En la epidermis de rana la enzima está inactiva como proenzima, y el proceso de activación se puede efectuar por acción de enzimas proteolíticas, por acción de la luz o simplemente por "envejecimiento" de la enzima con el tiempo. El proceso de activación lleva consigo un desplegamiento espacial de la molécula de la proenzima. En algunos sistemas se ha demostrado que la hormona estimulante de melanocitos incrementa la actividad tirosinasa a través del sistema AMP cíclico, en ciertas fases del ciclo celular.

Por otra parte, es interesante que en los melanomas existe gran actividad tirosinasa sensible a la hormona estimulante de melanocitos (HEM) y al AMPc en la fase G2 del ciclo celular y que los productos de oxidación de los fenoles son tóxicos al melanocito, lo cual puede ofrecer una posibilidad de quimioterapia, que se está investigando clínicamente en la Universidad de Yale.

Respecto al segundo proceso la translocación de gránulos de pigmentos, la redistribución en el interior celular hace que la piel tenga un aspecto u otro. Así en ranas y camaleones, si los gránulos se agregan en el interior del melanocito, alrededor del núcleo, la piel aparece clara, verdosa y con gran reflectancia, mientras que si los gránulos están bien dispersos a través del melanocito, la piel es oscura, negra o verde oscura, sin reflectancia. Pues bien, nuevamente la HEM a través de la producción de AMPc, actúa afectando en el proceso a unos microtúbulos cuya aparición es también consecuencia de la presencia del AMPc.

9. ENFERMEDADES METABOLICAS DEL SISTEMA AMPc

9.1. *Planteamiento.*

Cuando hace 20 años se comenzó a profundizar sobre el sistema cíclico, pocos investigadores pudieron pensar en su relación con la investigación clínica, pues era lógico imaginar que una lesión en ese sistema sería probablemente incompatible con la vida, lo que significaría que los errores genéticos en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos no podrían ser compatibilizados con la existencia de seres vivos que sufrieran

esos errores. Sin embargo en estos últimos años los conocimientos sobre estos problemas han hecho decir que las lesiones en el sistema ciclasa productoras de síndromes bien definidos, podrían ser fenómenos tan aceptados como la existencia del acné juvenil (41).

El sistema ciclasa se puede considerar como un lugar de malfunción más que como un patógeno en sí mismo, y en este sentido se hablaría de enfermedades del sistema adenilato ciclasa igual que se trata de las enfermedades hepáticas, con lo que se cubrirían aspectos tan diferentes, en cuanto a manifestaciones de la enfermedad, como los que van desde el pseudohipoparatiroidismo hasta el cólera o el cáncer, puntos a los que les dedicaremos un interés especial.

9.2. Pseudohipoparatiroidismo.

La hormona paratiroide (HP), al igual que sucede en el par proinsulina/insulina, se sintetiza como una prohormona un 20% mayor que la hormona: 105 aminoácidos en lugar de los 84 aminoácidos del péptido activo. La HP controla el metabolismo del calcio en 3 lugares primarios: a) Estimulo de la excrección de fosfato de la orina; b) incremento de la resorción ósea y c) Activación de la vitamina D.

En la Figura 16 se hace un resumen de las vías por las que la hormona paratiroide actúa a nivel óseo o renal y en la actualidad es evidente que tales efectos están mediados por el sistema adenilato ciclasa. En riñón, la hormona produce una AMPc-uria y posiblemente como consecuencia de la activación de una proteinquinasa, ello conduce a una fosfaturia. En la activación de la vitamina D, el AMPc consigue el incremento de producción del ARN mensajero codificador de la hidroxilasa específica que catalizará la síntesis de la forma activa de la vitamina. En el caso de la resorción ósea, los mismos efectos de aumento en el AMPc los produce la tirocalcitonina, pero las dos hormonas actúan sobre poblaciones separadas de células: la parathormona sobre las células primariamente relacionadas con la resorción ósea y la tirocalcitonina sobre las células que influyen en la nueva elaboración de tejido óseo.

Mientras en el hipoparatiroidismo primario hay un fallo en la producción de hormona paratiroide, el pseudohipoparatiroidismo ha sido el primer ejemplo reconocido de una enfermedad endocrina con patogénesis basada en el fallo del órgano final, esto es la falta de respuesta del órgano receptor a la presencia de cantidades usuales de hormona intacta y biológicamente activa. En un principio para explicar el problema se

(41) M. W. Bitensky, J. J. Keirns y J. Freeman; Amer. J. Med. Sci.; 266, 320, 1973.

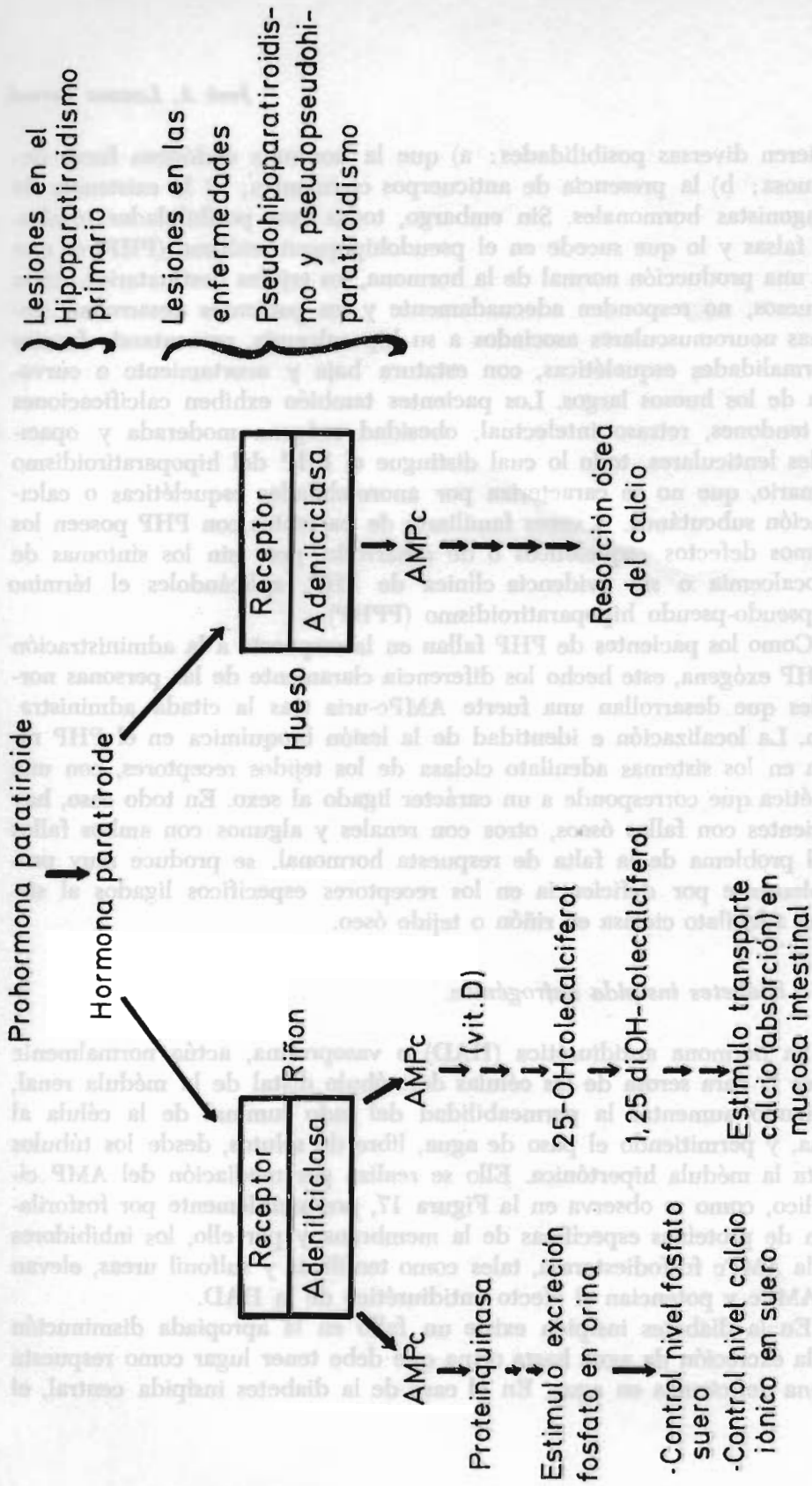


FIGURA 16. Funciones de la hormona paratiroide

sugieren diversas posibilidades: a) que la hormona endógena fuese defectuosa; b) la presencia de anticuerpos circulantes; c) la existencia de antagonistas hormonales. Sin embargo, todas esas posibilidades resultaron falsas y lo que sucede en el pseudohipoparatiroidismo (PHP) es que con una producción normal de la hormona, los tejidos destinatarios, riñón y huesos, no responden adecuadamente y los pacientes desarrollan síntomas neuromusculares asociados a su hipocalcemia, presentando fuertes anormalidades esqueléticas, con estatura baja y acortamiento o curvatura de los huesos largos. Los pacientes también exhiben calcificaciones en tendones, retraso intelectual, obesidad exógena moderada y opacidades lenticulares, todo lo cual distingue el PHP del hipoparatiroidismo primario, que no se caracteriza por anormalidades esqueléticas o calcificación subcutánea. A veces familiares de pacientes con PHP poseen los mismos defectos esqueléticos o de desarrollo, pero sin los síntomas de hipocalcemia o sin evidencia clínica de PHP, aplicándoles el término de pseudo-pseudo hipoparatiroidismo (PPHP).

Como los pacientes de PHP fallan en la respuesta a la administración de HP exógena, este hecho los diferencia claramente de las personas normales que desarrollan una fuerte AMPc-uria tras la citada administración. La localización e identidad de la lesión bioquímica en el PHP radica en los sistemas adenilato ciclasa de los tejidos receptores, con una genética que corresponde a un carácter ligado al sexo. En todo caso, hay pacientes con fallos óseos, otros con renales y algunos con ambos fallos y el problema de la falta de respuesta hormonal, se produce muy probablemente por deficiencia en los receptores específicos ligados al sistema adenilato ciclasa en riñón o tejido óseo.

9.3. *Diabetes insípida nefrogénica.*

La hormona antidiurética (HAD) o vasopresina, actúa normalmente sobre la cara serosa de las células del túbulo distal de la médula renal, haciendo aumentar la permeabilidad del lado luminal de la célula al agua, y permitiendo el paso de agua, libre de solutos, desde los túbulos hasta la médula hipertónica. Ello se realiza por mediación del AMP cíclico, como se observa en la Figura 17, presumiblemente por fosforilación de proteínas específicas de la membrana y por ello, los inhibidores de la AMPc fosfodiesterasa, tales como teofilinas y sulfonil ureas, elevan el AMPc y potencian el efecto antidiurético de la HAD.

En la diabetes insípida existe un fallo en la apropiada disminución de la excreción de agua hasta orina que debe tener lugar como respuesta a una deficiencia en agua. En el caso de la diabetes insípida central, el

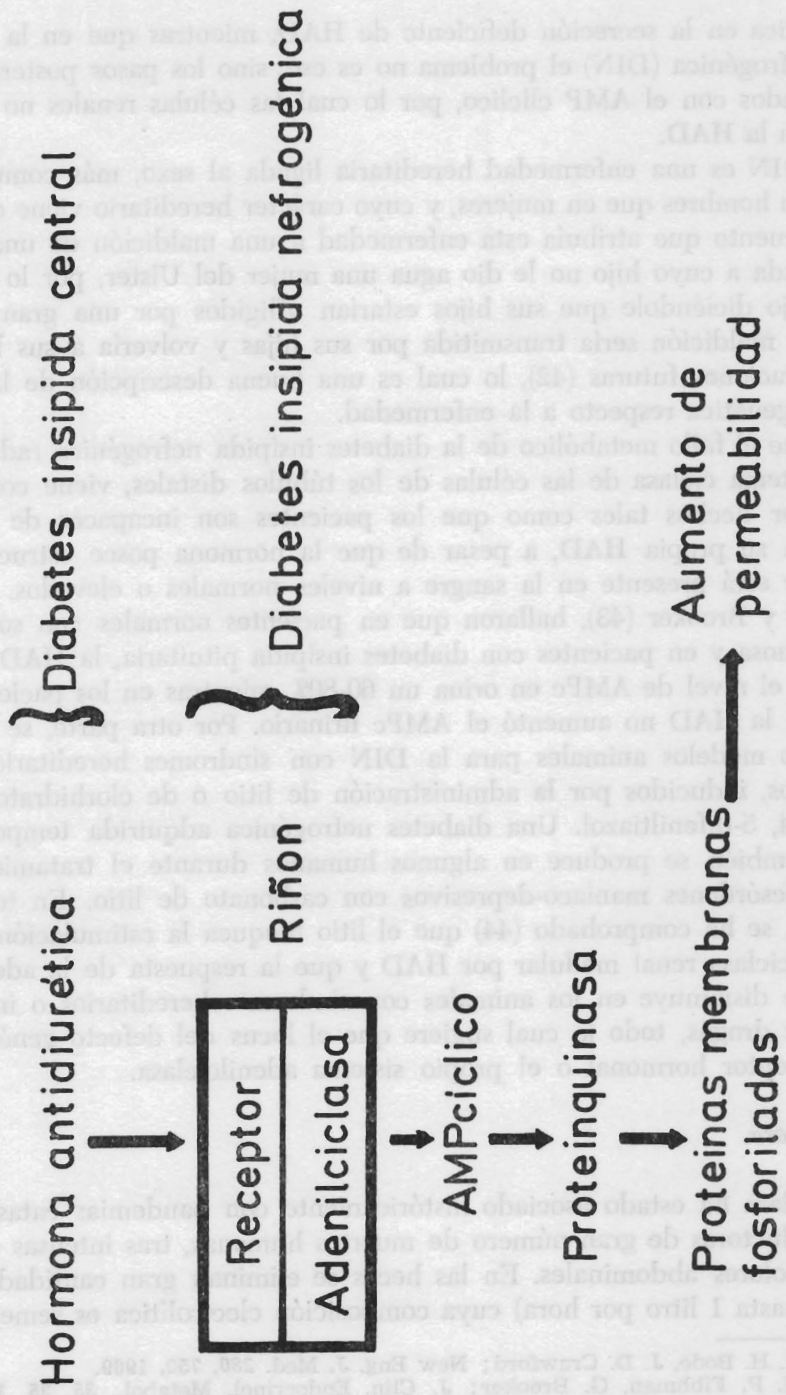


FIGURA 17. Función de la hormona antidiurética

fallo radica en la secreción deficiente de HAD, mientras que en la diabetes nefrogénica (DIN) el problema no es ese, sino los pasos posteriores relacionados con el AMP cíclico, por lo cual las células renales no responden a la HAD.

La DIN es una enfermedad hereditaria ligada al sexo, más común y severa en hombres que en mujeres, y cuyo carácter hereditario viene dado por un cuento que atribuía esta enfermedad a una maldición de una gitana airada a cuyo hijo no le dio agua una mujer del Ulster, por lo que la maldijo diciéndole que sus hijos estarían afligidos por una gran sed y que la maldición sería transmitida por sus hijas y volvería a sus hijos en generaciones futuras (42), lo cual es una buena descripción de la situación genética respecto a la enfermedad.

El que el fallo metabólico de la diabetes insípida nefrogénica radique en el sistema ciclasa de las células de los túbulos distales, viene confirmado por hechos tales como que los pacientes son incapaces de responder a su propia HAD, a pesar de que la hormona posee estructura normal y está presente en la sangre a niveles normales o elevados. Así, Fichman y Brooker (43), hallaron que en pacientes normales con sobrecarga acuosa y en pacientes con diabetes insípida pituitaria, la HAD aumentaba el nivel de AMPc en orina un 60-80%, mientras en los pacientes con DIN la HAD no aumentó el AMPc urinario. Por otra parte, se han estudiado modelos animales para la DIN con síndromes hereditarios o adquiridos, inducidos por la administración de litio o de clorhidrato de 2-amino-4, 5-difeniltiazol. Una diabetes nefrogénica adquirida temporalmente también se produce en algunos humanos durante el tratamiento de sus desórdenes maniaco-depresivos con carbonato de litio. En todos los casos, se ha comprobado (44) que el litio bloquea la estimulación de la adenilciclase renal medular por HAD y que la respuesta de la adenilciclase se disminuye en los animales con síndromes hereditarios o inducidos por drogas, todo lo cual sugiere que el locus del defecto genético es el receptor hormonal o el propio sistema adenilciclase.

9.4. Cólera.

El cólera ha estado asociado históricamente con pandemias catastróficas productoras de gran número de muertes humanas, tras intensas diarreas y dolores abdominales. En las heces se eliminan gran cantidad de fluidos (hasta 1 litro por hora) cuya composición electrolítica es semejan-

(42) H. H. Bode, J. D. Crawford; *New Eng. J. Med.* 280, 750, 1969.

(43) M. P. Fichman, G. Brooker; *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 35, 35, 1972.

(44) T. Dousa, R. Walter, I. L. Schwartz et al.; *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 1, 121, 1973.

te a la del suero, salvo en el hecho de que potasio y bicarbonato están elevados, lo que produce una acidosis metabólica acompañada de hipopotasemia por lo que se puede producir, como derivación, una insuficiencia renal o también una insuficiencia vascular secundaria a la deshidratación.

En 1884, Koch, demostró que la enfermedad se causaba por el "Vibrio cholerae", y sugirió que la diarrea se originaría por efecto de una exotoxina, pero hasta recientemente no se ha podido iniciar la profundización en el conocimiento íntimo de la acción molecular, demostrándose que la mucosa intestinal durante el proceso está intacta morfológicamente y funcionalmente, y que el proceso está mediado por el sistema adenilciclasa. Desde 1960 se han conseguido progresos importantes en la purificación y caracterización de la toxina colérica, que es una proteína de peso molecular 84000 y que produce diarreas semejantes a las del cólera cuando se instila en el intestino delgado. Por otra parte, sueros específicos anti-toxina fueron viables contra la acción de los "Vibrio cholerae" demostrando que la toxina es el único agente responsable de las diarreas.

En la Figura 18 se resumen de un modo global algunos de los conocimientos sobre las acciones de la toxina y otras sustancias a nivel del sistema adenil ciclasa. Los "Vibrio cholerae", producen una exotoxina que activa el sistema adenil ciclasa, con un mecanismo cuya naturaleza ha sido estudiada, entre otros, por el bioquímico de origen español Pedro Cuatrecasas (45). Hay alguna evidencia de que ciertos glicolípidos deben estar presentes en la membrana celular para que tenga lugar el enlace y en concreto Van Heyningen (46), descubrió que la toxina colérica se podía inactivar por monosialogangliosidos específicamente, quizás porque actúen como secuestradores de la toxina, mientras que la incubación de la membrana con monosialogangliosidos produce aumento en la respuesta biológica a la toxina. Por otra parte, la enzima neuraminidasa aumenta el número de lugares de enlace sobre la membrana celular y por tanto la eficacia de la toxina. Esta es la explicación de que la toxina "cruda" sea mucho más potente (posee neuraminidasa como contaminante) que la purificada. Los "vibrio cholerae" producen asimismo una proteína, coleragenoide, muy relacionada con la toxina (posiblemente sea semejante, pero faltándole alguna subunidad) y Cuatrecasas demostró que compite con la toxina por los sitios de enlace.

La exotoxina produce un aumento en el AMP cíclico en las células intactas (47) por estimulación de la adenil ciclasa, no por inhibición de la

(45) P. Cuatrecasas; *Biochemistry*, 12, 3558, 1973.

(46) C. A. King, W. E. Heiningen; *J. Infect. Dis.*, 127, 639, 1973.

(47) D. E. Schafer, W. D. Lust, B. Sircar et al.; *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, 67, 851, 1970.

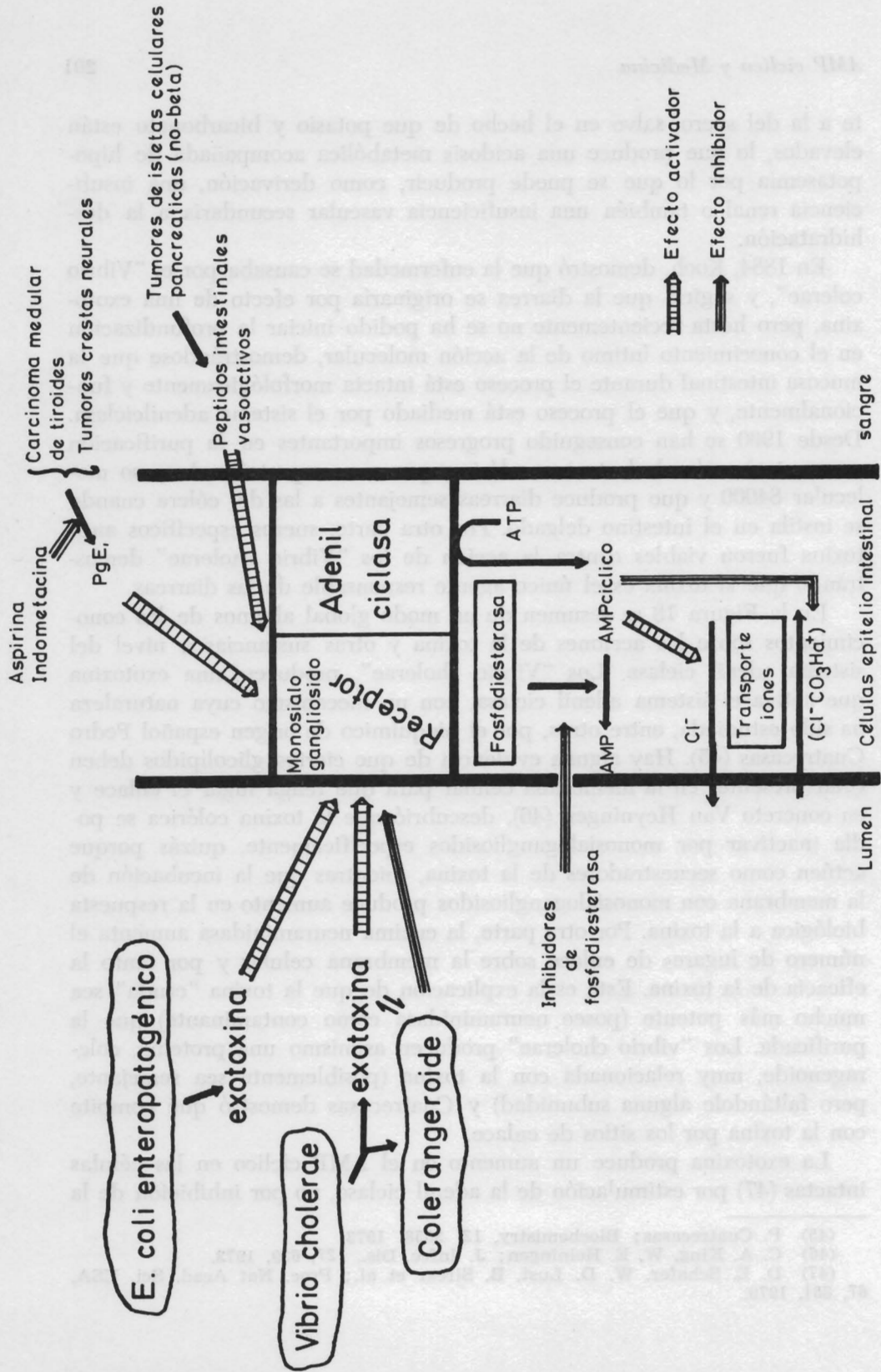


FIGURA 18. AMPc y cólera

fosfodiesterasa y el proceso necesita un período de retardo de cerca de una hora. El enzima se activa pero sus características cinéticas permanecen constantes. Las biopsias de especímenes de intestino humano durante el proceso clínico del cólera han demostrado una mayor actividad adenilciclase comparada con la de las muestras tomadas en su convalecencia.

El AMP cíclico así producido, actúa sobre los sistemas de transporte iónico en las células del epitelio intestinal, como se ha podido medir por el uso de radioisótopos. En epitelio normal intestinal existe absorción neta de Na^+ y Cl^- desde el lumen a la sangre. Por el contrario al aplicar AMP cíclico o inhibidores de fosfodiesterasa (teofilina) al lado seroso, la consecuencia global es la de que no hay absorción neta de sodio y se produce una reversión del flujo de Cl^- hasta una secreción, por lo cual se cambia el valor neto normal de absorción de soluto y agua hasta producirse una gran secreción. Como es lógico, el efecto al añadir la toxina es el mismo que con el AMP cíclico y si una de las sustancias ya está presente, la otra no tiene efecto.

Otras diarreas similares a las del cólera, también parecen producirse por mecanismos semejantes. Así, como consecuencia de carcinomas medulares de tiroides y tumores de cresta neural, se originan grandes diarreas cuyo origen puede ser la liberación de grandes concentraciones de prostaglandinas en la sangre y estas prostaglandinas, como la PG E_1 , activan la adenilciclase de la mucosa intestinal de un modo inmediato, sin período de retardo. La aspirina o la indometacina que inhiben la síntesis de prostaglandinas, reducen la secreción de fluido.

Cierto número de hormonas peptídicas, incluyendo péptidos intestinales vasoactivos, ocasionan secreción de fluido en el intestino delgado y en algún caso se ha demostrado su efecto estimulante sobre la mucosa intestinal y en este hecho puede estar la explicación de diarreas asociadas con algunos tumores de células isletas de páncreas (no beta), que liberan ciertos péptidos en la sangre.

En ese mismo orden de cosas es interesante señalar que algunas cepas de bacterias "Escherichia coli" enteropatógenicas producen también exotoxinas que estimulan la secreción de fluido por estimulación de adenilciclase del mismo modo que la toxina del cólera. Más aún, pacientes con diarreas crónicas en los trópicos, poseen abundantes microorganismos intestinales que producen concentraciones altas intraluminales de etanol y de enterotoxinas que estimulan adenil ciclase, lo que sería el origen de sus diarreas.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la disponibilidad de la toxina del cólera ha hecho avanzar los conocimientos sobre el sistema adenilciclase de otros materiales diferentes del intestinal, obteniéndose valiosas

informaciones sobre glicogenolisis hepática, lipolisis en tejido adiposo, permeabilidad de membranas hepáticas, esteroidogénesis en corteza adrenal, génesis de inmunoglobulinas, permeabilidad inflamatoria vascular, etcétera, demostrando, una vez más, cómo los descubrimientos hechos a partir de consideraciones clínicas pueden posteriormente servir de gran ayuda a la investigación básica fundamental.

9.5. *Glucogenosis*

Como ya hemos señalado anteriormente, el descubrimiento del AMP cíclico y de la adenilciclase se produjo como consecuencia inmediata del estudio del control hormonal del metabolismo del glucógeno. Como este tema es ya clásico dentro de la Bioquímica y de la Patología, sólo se reseñarán aquí los aspectos de mayor interés en relación con el sistema adenilciclase.

En primer lugar, ya hemos hablado anteriormente de los sistemas en cascada glucogenosintéticos y glucogenolíticos con lo que el mecanismo puede responder de un modo bellamente eficiente y específica e intermitentemente a las hormonas glicolíticas a través de la activación de la glucogenolisis y simultánea inhibición de la glucogenosíntesis. Es realmente fascinador el descubrimiento de Villar-Palasi y Larner (48) de que las dos enzimas claves en la degradación y síntesis del glucógeno, la fosforilasa y la glucógeno sintetasa, poseen una zona idéntica de composición con siete residuos aminoácidos, donde se aloja el residuo del hidroxiaminoácido serina, que es el que se fosforila y desfosforila como consecuencia de la acción hormonal, llegándose a un enzima activo o inactivo, según los casos, y consiguiendo efectos opuestos con el mismo sistema de control.

Es inmediato pensar al observar el esquema adjunto de la Figura 19, que existen numerosos lugares posibles para malfunciones relacionadas con el sistema ciclase. Se podrían incluir anormalidades respecto a la hormona, el receptor hormonal, la fracción catalítica de la ciclase, la fosfodiesterasa o cualquiera de las demás enzimas posteriores tales como proteinquinasa, fosforilasa quinasa, fosforilasa fosfatasa, quinasa de fosforilasa sintetasa, glucógeno sintetasa, etc. En todos los casos se producirían anormalidades en el almacenamiento usual del glucógeno.

Simplemente, como sugerencia, indicaremos que si hubiese una actividad anormalmente baja en fosfodiesterasa o en fosfatasa, producirían

(48) C. Villar-Palasi, J. Larner y L. C. Shen; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 185, 74, 1971.

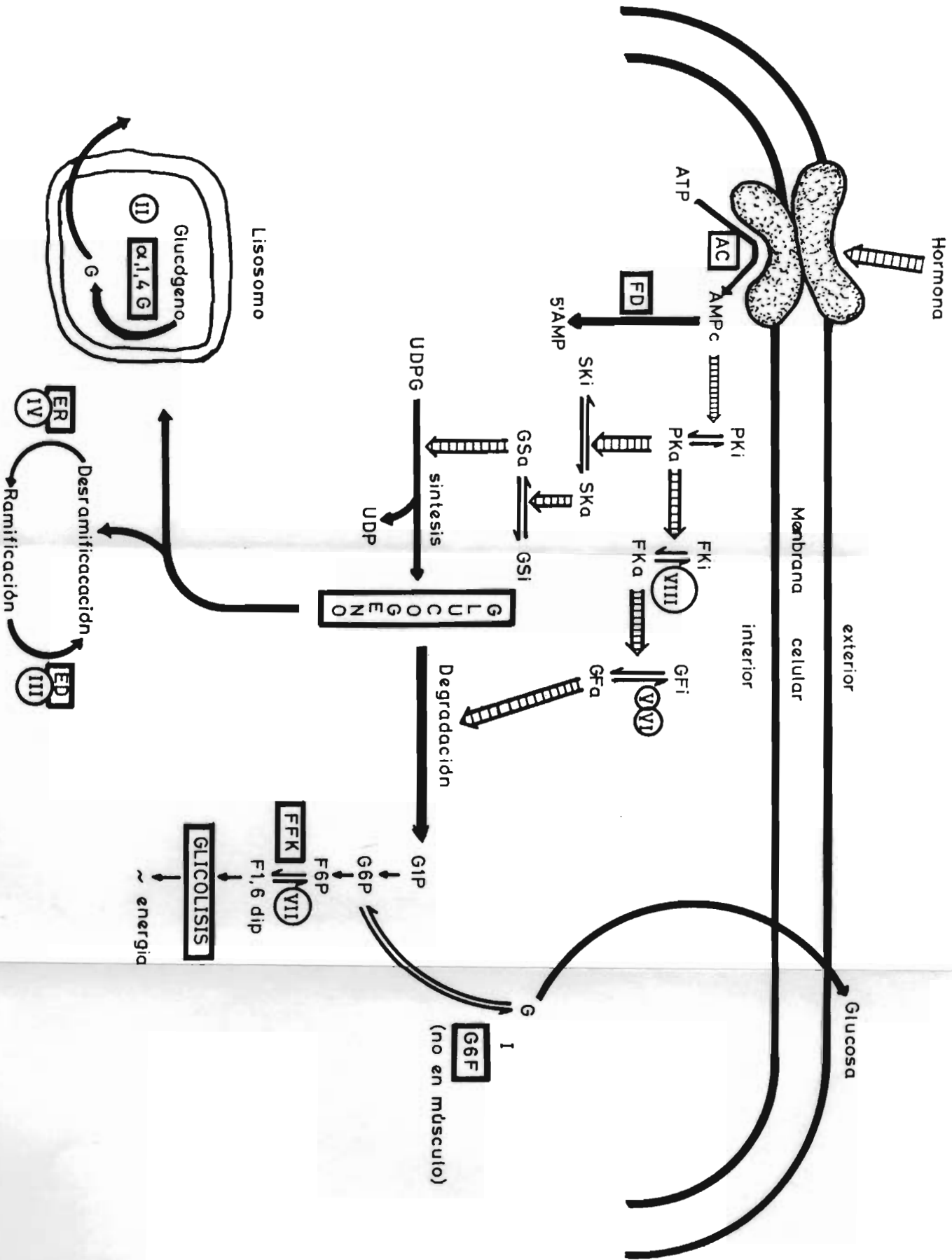


FIGURA 19. AMPc y metabolismo del glucógeno

una movilización de glucógeno continua y excesiva, lo que se presentaría clínicamente como una diabetes resistente a la insulina.

Las glicogenosis actualmente más conocidas son las que corresponden a los tipos I al VIII y su localización metabólica está señalada en la Figura 19. En cada caso, o bien no se sintetiza el enzima o no actúan bien los mecanismos de activación, dando lugar a todos los cuadros clínicos que tan llamativos y conocidos son. Como es lógico, aparte de los 8 tipos clasificados existen otras variedades más o menos estudiadas, como la descrita por Hug en la que la lesión es probablemente una proteinkinasa estimulada por AMP cíclico y cuyo funcionamiento es defectuoso. En todo caso las enfermedades de almacenamiento de glucógeno son ejemplos claros de la necesidad de una comprensión bioquímica profunda para poder abordar un manejo clínico adecuado, aunque para su solución definitiva quizás tengamos que esperar al esperado desarrollo futuro de la ingeniería genética que pudiera permitir sustitución de una enzima por otra adecuadamente codificada. Hasta tanto, el diagnóstico precoz y el consejo genético son modos imperfectos, pero imprescindibles para abordar este tipo de enfermedades, al menos las más serias.

9.6. *Psoriasis.*

La piel es uno de los órganos más amplios del cuerpo y muchas de sus actividades celulares y bioquímicas están sometidas a control hormonal, tal como sucede con la expresión de las características sexuales secundarias y el efecto sudorífico de la adrenalina. Entre las enfermedades comunes de la piel, la psoriasis posee de un modo especial las características de posibles defectos en la regulación celular. Como consecuencia de la psoriasis, aparecen una serie de hechos, reunidos en la Figura 20, tales como: mayor proliferación de células epidérmicas; mayor número de células en mitosis en la epidermis psoriática que en la normal; aumento de síntesis en el ADN; ciclo celular más corto; mayor velocidad en el movimiento de las células hacia el estrato córneo; "turnover" incrementado de proteínas; mayor uso de la glucosa, con actividad incrementada de los enzimas glicolíticos; depósito de glucógeno en la epidermis. Todas estas anomalías sugieren un desajuste en los controles celulares, muchos de los cuales están mediados por el AMPc, por lo que se ha pensado en su intervención en el proceso psoriático bien directamente en el sentido de que un desajuste en el sistema ciclasa sea responsable de la enfermedad, o bien que como una consecuencia de ésta se altera el sistema adenilciclasa. Desde luego se han encontrado numerosos indicios que abogan por una estrecha relación entre el sistema ciclasa

y la psoriasis (49-51), tales como los siguientes: existe adenilciclase en la piel humana que sintetiza AMP cíclico y que se activa de 10-35 veces por adrenalina; en la piel psoriática existe una menor actividad adenilciclase y ésta es muy poco sensible a la adrenalina o al fluoruro sódico, mientras que la piel normal de los pacientes psoriáticos poseen la adenilciclase normal; existen dos fosfodiesterasas en epidermis, una de K_M alta ($100 \mu M$) y la otra con K_M baja ($2 \mu M$) y esta última fosfodiesterasa está aumentada en las zonas lesionadas con psoriasis.

Todos los datos anteriores y otras mediciones directas, explican una menor concentración de AMPc en las zonas psoriáticas, mientras que por otra parte se conoce de estudios "in vitro", que este nucleótido cíclico inhibe directamente la división epidérmica celular, por todo lo cual es evidente la conexión entre el sistema ciclase y la psoriasis aunque no se puede asegurar que la causa de la enfermedad sea un fallo en la cascada de adenilciclase, pero nuevas perspectivas son evidentes desde que se sabe que la aplicación del dibutiril-AMPc funcionó como un inhibidor efectivo de la mitosis epidérmica de la psoriasis.

9.7. Cáncer.

Uno de los descubrimientos más excitantes en los últimos años ha sido la evidencia de que el AMPc está implicado en la génesis de algunos o de muchos tipos de tumores cancerosos.

Podemos simplificar la cuestión aceptando la hipótesis de que en algunos casos el cáncer es el resultado de la derepresión de la actividad de ciertas partículas de tipo vírico que posiblemente jueguen un papel importante al principio de la embriogénesis, pero que normalmente se encuentran reprimidas en etapas posteriores. En principio, su incorporación al ADN de las formas superiores tales como las humanas, podría ser muy parecida a la incorporación de ADN vírico (en forma de profago en letargo) al ADN de bacterias lisogénicas. Así, factores que se sabe deprimen el profago produciendo la replicación viral en las bacterias y la lisis de estas células bacterianas son de naturaleza carcinogénica cuando se suministran a células de mamífero.

Por ello, cuando en 1971 se conoció que niveles altos de AMPc en bacterias favorecían la lisogenia mientras que valores bajos conducían a la lisis, se pensó en la posibilidad de que niveles altos de AMPc en cé-

(49) S. L. Hsia, M. M. Mul, R. K. W. Hurst y K. M. Halprin; *Archo. Dermatol.* III, 205, 1975.

(50) J. J. Voorheers; *British J. Dermatol.*, 90, 223, 1974.

(51) L. E. King, S. S. Solomon y K. Hashimoto; *J. of Invest. Dermatol.*, 64, 390, 1975.

lulas humanas pudiesen reprimir la oncogénesis mientras que concentraciones bajas causarían la derepresión y por tanto la iniciación de procesos cancerosos.

¿Qué datos existen sobre este tema? Por su interés, el número de publicaciones es elevadísimo y muchas conclusiones son contradictorias, pero vamos a intentar expresar las evidencias más claras, que apoyan de un modo bastante sugestivo, al menos parcialmente, la hipótesis anterior.

Los cultivos de células de fibroblastos, que contribuyen a la formación del tejido conectivo, cuando se exponen a la acción de sustancias cancerígenas o de ciertos virus oncogénicos, se "transforman" apareciendo células de tipo tumoral que inyectadas a huéspedes producen tumores. Las células transformadas cancerosas se diferencian de las normales en el cambio de su morfología, el crecimiento acelerado, la disminución de su adhesión a la superficie del recipiente contenedor, la alteración en la producción de mucopolisacáridos, la mayor agregación ocasionada por lectinas vegetales, etc., y todo ello se puede producir como consecuencia de bajos niveles de AMPc. Desde 1971, gracias a los trabajos de Otten (52) y otros investigadores, se ha comprobado que los cultivos de fibroblastos transformados poseían menos AMPc que las células normales y que la adición de AMPc hacía revertir su comportamiento anormal, haciendo que las células cancerosas tiendan a parecerse a las normales.

Otro tipo de experiencias también debidas al equipo de Otten (53) fueron las conseguidas con un mutante del virus de sarcoma de Rous que produce transformaciones muy rápidas sólo si la temperatura se baja, por ejemplo a 36°C, mientras que a temperaturas superiores tal como 40°C, la apariencia de las células infectadas es normal. En tales casos la adición al medio de cultivo celular de un derivado del AMP cíclico evitaba siempre el proceso de malignización de las células infectadas con el virus al pasar de la temperatura superior a otra inferior. Incluso se ha podido descubrir recientemente que las células transformadas poseen una actividad adenilato ciclasa muy inferior a la de las células normales y que ello podría ser la causa de la reducción en la concentración del AMP cíclico y por tanto del proceso de malignización. Más recientemente aún (54), en fibroblastos de embriones de pollo transformados por otros virus de sarcoma, se ha comprobado análogo fenómeno, con reducción de la actividad adenilato ciclasa pero sin alterarse la fosfodiesterasa. Por otra parte las características de la adenilato ciclasa (K_M , sensibilidad, cinética, et-

(52) J. Otten, G. S. Johson y I. Pastan; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1192, 1971.

(53) J. Otten, J. P. Baden, G. S. Johson y I. Pstan; *J. Biol. Chem.*, 247, 1632, 1972.

(54) M. Yoshida, M. Owada y K. Toyoshima; *Virology*, 63, 68, 1975.

cétera), variaron según el tipo de virus utilizado. Otros grupos de investigadores también han mostrado cambios en las propiedades de adenilato ciclasa, por ejemplo en su sensibilidad a neurotransmisores, a PGE₁ y a GTP, en células malignas de neuroblastoma en relación con las células nerviosas normales diferenciadas (55).

También en esta línea general sobre el papel del AMP cíclico en los procesos cancerosos, podemos señalar los resultados del Tisdale (56) sobre el efecto antitumoral del ácido ascórbico y deshidroascórbico, de los cuales se conocían ya tanto las propiedades de inhibidor de crecimiento del ácido deshidroascórbico como que los niveles de ascorbato bajan dramáticamente en células neoplásticas y que los requerimientos de ácido ascórbico son normalmente altos en pacientes cancerosos. A nivel molecular, parece comprobado que ambos ácidos funcionan como inhibidores reversibles de las dos formas (de alta y de baja afinidad) de fosfodiesterasa en el caso de carcinoma de Walker, mientras que el ácido deshidroascórbico sólo inhibe, no competitivamente, la forma de alta afinidad del enzima procedente de hígado de rata. Por ello estos ácidos producirían un aumento en el contenido del AMPc.

El efecto inhibidor "in vitro" del derivado dibutírico del AMPc también es evidente en otros tipos diferentes de tumores tales como melanomas de peces (57) o en tumores experimentales de tiroides en ratas (58) y en carcinomas de mamas (59), donde se produce la desaparición de la isoenzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa microsomal.

Más interés tienen aún, desde el punto de vista práctico, las experiencias "in vivo" que se vienen realizando desde hace un par de años. Así, Cho-Chung (60) ha conseguido "in vivo" inhibir en ratas el crecimiento de algunos tumores mamarios, dependientes hormonalmente, por administración de dibutiril-AMPc, aunque al cesar la administración continuó el crecimiento tumoral. Otros derivados también han tenido efecto en algunos tumores (entre los que se incluyen ciertos hepatomas) pero en otros casos no ha habido éxito todavía (61). La situación puede ser más complicada y así recientemente se ha señalado que una parte basal del AMPc de células Hela (cultivo S3) se encuentra protegido por la acción

(55) V. N. Prasad, K. N. Gilmer, S. K. Sahu y G. Becker; *Cancer Res.*, 35, 77, 1975.

(56) M. J. Tisdale; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 877, 1975.

(57) U. Vielkind, y J. Vielkind; *IRCS (73-3)* 3-8-2, 1973.

(58) M. D'Armient y F. Monaco; *Biochim. Biophys. Acta*, 372, 176, 1974.

(59) Y. S. Cho-Chung y B. Berghoffer; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 60, 528, 1974.

(60) Y. S. Cho-Chung y P. M. Gullino; *Science*, 183, 87, 1974.

(61) Y. S. Cho-Chung; *Cancer Res.*, 34, 3492, 1974.

de fosfodiesterasa, por su unión a ciertas proteínas (62), por lo que, por ejemplo, la teofilina, no actúa aumentando el nivel de AMP cíclico en esas células, ni tampoco el tratamiento con dibutilil AMPc produce elevación en el nivel de AMPc.

La relación del AMPc con procesos cancerosos puede tener otros aspectos inéditos tales como el hallazgo, recientemente, de que el tratamiento con compuestos que aumentan los niveles intracelulares de AMPc en 27 diferentes tipos de células, hace incrementar el efecto carcinogénico de sustancias químicas ambientales tales como el benzopireno (63). Debe por tanto estar claro que otros muchos factores aparte del AMPc, pueden estar involucrados a la carcinogénesis. Así cabría imaginar que algunas células de mamíferos pudieran perder algún componente necesario para que al interconectarse con él, el AMPc evite la mitosis de tal modo que en ese caso ni aun grandes cantidades de AMPc podrían evitar la proliferación celular. Otra posibilidad es la de un fallo en etapas metabólicas posteriores a la de adenil ciclasa. Así Granner (64) ha indicado que una línea de células de hepatoma es deficiente en el componente regulador del sistema protein quinasa. Pero en resumen hemos de indicar que con el descubrimiento de la relación cáncer-AMP cíclico, se han abierto nuevas perspectivas no sólo para la comprensión científica de los procesos malignos, incluso a nivel molecular, sino también para una posible aplicación práctica terapéutica de sustancias relacionadas con el sistema de la adenil ciclasa.

9.8. Otras enfermedades.

Existen otros desórdenes que pueden estar relacionados con alteraciones en los niveles de AMP cíclico. Así sucede en el asma bronquial y otras alergias atópicas y en ciertas formas de hipertensión arterial en cuyas situaciones la concentración de AMP cíclico siempre es baja. Por el contrario, la diabetes mellitus, caracterizada por una falta de insulina, puede ser una enfermedad crónica en la que haya un nivel altamente excesivo de AMP cíclico tanto en tejido hepático como en adiposo. Muchos de los desarreglos metabólicos asociados a la diabetes mellitus, parecen ser el resultado de un nivel aumentado del AMP cíclico secundario a la deficiencia absoluta o relativa de insulina. Incluso se ha demostrado que la excreción de AMPc en pacientes diabéticos no tratados, es consistentemente más alta que en los mismos pacientes tratados con insulina o que

(62) H. Hilz, E. Kankel, U. Wieggers y U. Fuhrmann; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 64, 519, 1975.

(63) E. Huberman, H. Yamasaki, L. Sachs; *Int. J. Cancer*, 14, 789, 1974.

(64) D. K. Granner; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 46, 1519, 1972.

en pacientes normales, ya que la insulina, por diversos mecanismos, consigue bajar la concentración de AMPc.

Recientemente se ha demostrado el papel patogénico del AMPc en el desajuste de la capacidad concentradora de orina en hipercalcemias agudas, a través del sistema vasopresina, dependiente de AMPc, así como que en riñones hipercalcémicos el calcio ejerce un efecto directo inhibitor sobre la adenilato ciclasa de la médula renal, lo que se traduce en una menor capacidad concentradora de la orina (65).

10. APLICACIONES CLINICAS DE LA DETERMINACION DEL AMPc.

Hemos visto que la acción de muchas hormonas implica la modificación de la concentración intracelular del AMPc, por lo cual es de esperar que en las enfermedades o procesos con componentes endocrinos, se produzcan variaciones en las tasas intracelulares y extracelulares del AMPc, cuyo conocimiento puede ser útil para el diagnóstico del estado fisiológico normal o patológico del individuo. Entre los numerosos ejemplos de la bibliografía podríamos citar:

- a. Un aumento progresivo de la tasa de AMPc a lo largo del embarazo, con una disminución brusca tras el parto. De utilidad puede ser el hecho de que la excreción del AMPc es menor de la mitad de su valor normal en pacientes con toxemias al final del embarazo, ya que la etiología de la toxemia todavía se desconoce a pesar de que puede alcanzar porcentajes significativos, del orden del 6% de las mujeres embarazadas (66).
- b. Un máximo a mitad de cada ciclo menstrual, con una curva de eliminación que parece seguir la de la tasa del estrógeno.
- c. Grandes variaciones en la excreción del AMP cíclico en los casos de desórdenes mentales con un aumento en los maníacos y disminución en las depresiones psicóticas. De todos modos este puede ser un ejemplo de que se ha de adoptar una actitud de prudencia para juzgar el cúmulo de observaciones que, diariamente se van produciendo sobre el AMPc. En efecto, en el caso de los enfermos maníacos, el tratamiento eficaz por ciertas drogas ha sido seguido por una normalización del AMPc urinario, por lo cual es tentador atribuir un papel patogénico a las perturbacio-

(65) N. Beck, H. Singh, S. W. Reed, H. V. Murdaugh y B. B. Davis; *J. Clin. Investig.*, 54, 1049, 1974.

(66) K. Raij, M. Härkönen, O. Castrén, S. Saarikoski y H. Adlercrentz; *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 32, 193, 1974.

nes del metabolismo de este nucleótido pero se ha podido demostrar que en el caso de los maníacos, la hiperactividad motriz por sí sola puede explicar la anomalía en la excreción urinaria del AMPc, lo que viene corroborado por los niveles normales del nucleótido en el líquido cefalorraquídeo.

- d. En niños se han estudiado los niveles del AMPc en orina y fluido cerebroespinal, concluyendo que disturbios metabólicos, procesos que dañan al sistema nervioso central o hiperfunción hipotalámica producen incrementos de los valores del AMPc en fluido cerebroespinal, mientras que una caída en la producción de catecolaminas significa una disminución de la excreción urinaria del AMP cíclico.
- e. Anteriormente hemos señalado que el AMPc refleja bien la actividad de la parahormona, con eliminaciones acrecentadas en el caso de hiperparatiroidismo con función renal normal, mientras que hay una baja significativa en situaciones de hipo o pseudohipoparatiroidismo.
- f. En cualquier caso, muchos sistemas hormonales se pueden afectar por lesiones que por tanto pueden alterar la eliminación del AMPc y así en niños con quemaduras se ha encontrado cierta correlación entre el aumento de la excreción urinaria del AMP cíclico y la severidad de las quemaduras, siempre que éstas afectasen menos del 25% de la superficie corporal.
- g. Tanto en las obstrucciones del conducto pancreático o en glucagonomas como se produce una hipersecreción del glucagón, la consecuencia es una elevación importante del AMPc plasmático y urinario.

11. OTROS NUCLEOTIDOS CICLICOS.

11.1. *Generalidades.*

En 1963 Ashman y col. (67), descubrieron la presencia de 3',5'-GMP cíclico en orina de rata. A pesar de ello hasta estos últimos años no ha emergido la idea de que este nucleótido cíclico pudiese tener importancia por sí mismo debido a su posible papel regulador en multitud de procesos fisiológicos. La razón ha sido, al igual que en otras áreas de la Bioquímica, que no se contaba hasta recientemente con métodos adecuados

(67) D. F. Ashman, R. Lipton, M. Milicow y T. D. Price; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11, 330, 1969.

de detección y medida, siendo su concentración intracelular muy pequeña, 10^{-8} - 10^{-9} M, o sea de 10-50 veces menor que la del AMPc. Hoy día se tiene el convencimiento de que el GMPc puede poseer la misma importancia que el AMPc como mediador intracelular de la regulación metabólica del crecimiento.

En efecto, el metabolismo global del GMPc se parece bastante al del AMPc (Figura 21) y así existen enzimas guanilato ciclasas que catalizan su síntesis a partir del GTP, así como fosfodiesterasas que lo transforman en 5'GMP. Por otra parte una acción importante del GMPc parece ser la de actuar a nivel de protein quininas, al igual que sucedía con el AMPc. Observemos con algo más de detalle la situación.

11.2. Guanilato ciclasas.

Se trata de enzimas dependientes de Mn^{+2} , específicas para el sustrato GTP y que se vienen detectando de un modo general en casi todos los tipos de tejidos que se han estudiado, al igual que sucede con la adenilato ciclasa. Sin embargo la principal diferencia es la de que la enzima no está en forma estrictamente particulada, sino que en todos los tejidos de mamíferos parecen existir dos tipos de guanilato ciclasas (68), una soluble y otra particulada, con propiedades físicas, cinéticas y catalíticas diferentes, tales como peso molecular (450.000 y 800.000 respectivamente), constantes de Michaelis ($12-65 \mu M$ y $50-100 \mu M$ para GTP) activadores (Ca^{+2} estimula a la primera e inhibe a la segunda), inhibidores (el 50% de inhibición por ATP se consigue con 0,4 mM en el primer caso y más de 1mM en el segundo), etc. Es muy importante señalar que hasta ahora, a diferencia de adenilato ciclasas, las guanilato ciclasas no se han comprobado que pueden ser reguladas en su actividad por acción directa hormonal. Sin embargo existirían otras posibilidades de regulación de estas enzimas y por tanto de los niveles de GMPc: 1) Factores que afectan a la naturaleza aparentemente cooperativa de la enzima; 2) Interacciones de la enzima o del sustrato con iones; 3) Factores que puedan eliminar la inhibición producida por ATP; 4) Actuación de mecanismos que regulen la interconversión entre formas latentes y activas de la enzima; 5) Posibilidad de intercambio entre las formas solubles y articuladas; 6) Inducción o represión de la enzima.

11.3. GMPc fosfodiesterasa.

También las fosfodiesterasas vienen siendo halladas en diferentes tejidos y organismos vivos desde procarióticos a mamíferos, pero el proble-

(68) H. Kimura y F. Murad; *Metabolism*, 24, 439-445, 1975.

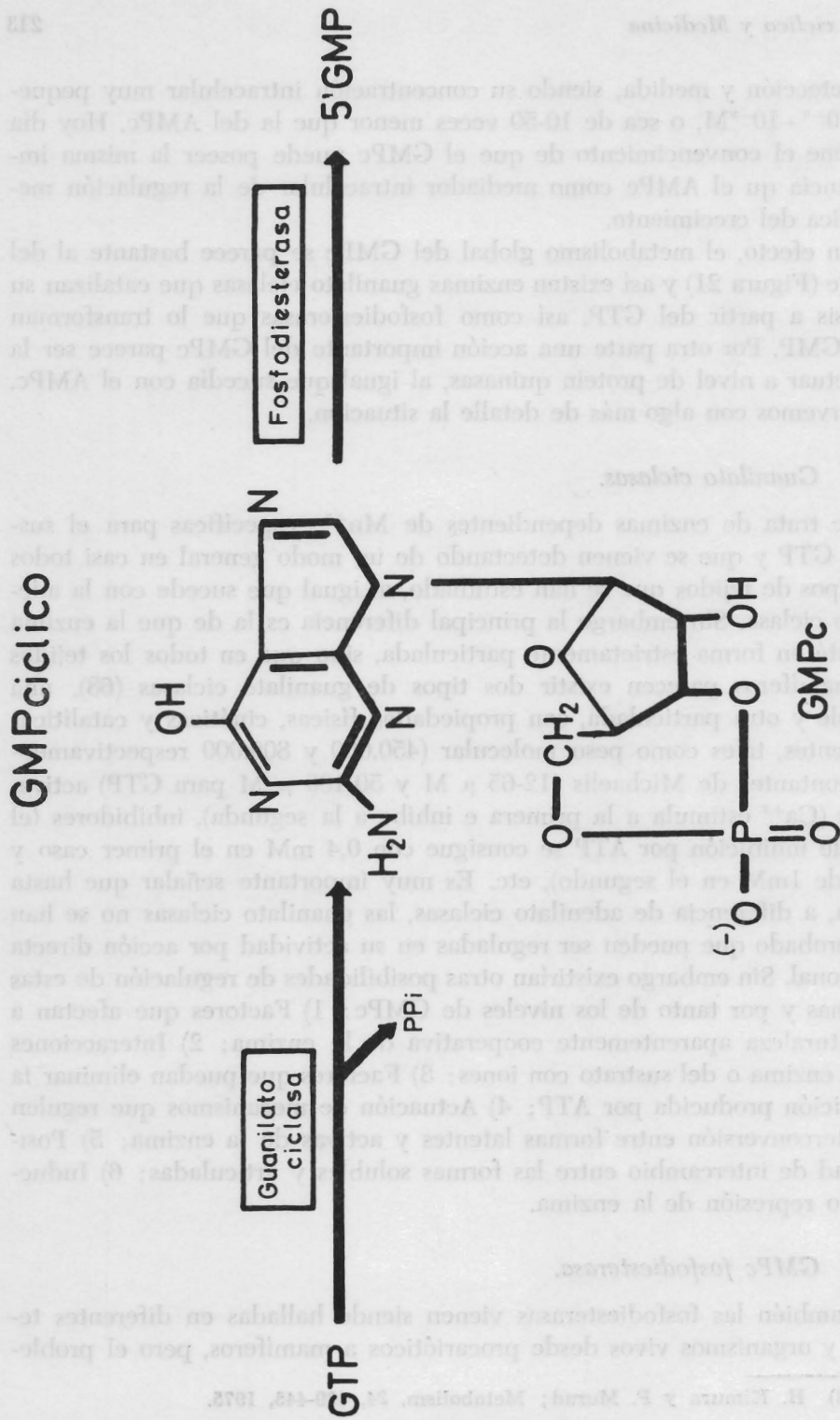


FIGURA 21. GMP cíclico

ma puede radicar en si existen o no enzimas específicas para cada nucleótido cíclico, ya que la especificidad de la fosfodiesterasa del AMPc no es tan grande que no pueda actuar también sobre el GMPc. Recientemente se viene demostrando la existencia de diversos tipos de fosfodiesterasas en cada tejido y al menos en fibroblastos de embrión de pollo (69), se ha podido comprobar la existencia de fosfodiesterasas específicas para AMPc y para GMPc y que están bajo control genético separado, con lo cual el metabolismo de cada nucleótido puede seguir sus propias vías específicas, lo que puede tener gran transcendencia en cuanto a sus funciones de control.

11.4. *Protein quinasas dependientes de GMPc.*

Una acción primordial del GMPc parece ser coincidente con la del AMPc: actuar como activador de sistemas protein-quinasa que catalicen la fosforilación de proteínas específicas que de este modo alteran sus actuaciones metabólicas. Efectivamente y siguiendo en la línea de similitud, pero independientemente respecto al AMPc, se han encontrado diferentes protein quinasas, que dependiendo del lugar de procedencia, son inespecíficas o específicas hacia uno u otro nucleótido cíclico. Por otra parte también diferencia la actividad de estas protein quinasas la acción de los llamados "moduladores de protein quinasas" que son moléculas peptídicas que pueden afectar, tal como se expresa en la Figura 22, la acción de la enzima, la cual está compuesta por subunidades reguladoras (R) y catalíticas (C), produciendo la presencia del nucleótido cíclico la separación de la unidad catalítica, mientras la reguladora queda unida al nucleótido cíclico (70). La unidad catalítica libre, en presencia de ATP y del sustrato proteínico adecuado, cataliza la fosforilación de este último, pero la transformación se regula por la acción de los citados "moduladores", que se unen a la unidad catalítica alterando su afinidad por el sustrato. Existen datos que indican que la acción normal de tales moduladores es opuesta para los sistemas del AMPc y del GMPc, de modo que el modulador puede favorecer la actividad protein quinasa en el primer caso y desfavorecer la del segundo caso, lo que estaría de acuerdo con la teoría que desarrollaremos más adelante sobre la divergencia de efectos del AMPc y GMPc actuando el modulador como un control biológico del proceso.

(69) T. R. Russell y I. H. Partan; *J. Biol. Chem.*, 249, 7764-7769, 1974.

(70) J. F. Kuo; *Metabolism*, 24, 321-329, 1975.

11.5. Acciones del GMP cíclico.

Al igual que con el AMP cíclico, el GMP cíclico está relacionado con gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos y el problema radica en obtener una visión de conjunto a partir de los abundantísimos datos bibliográficos. Como ejemplo de tal variedad, citamos algunos de los más sólidamente establecidos en estos últimos años:

- a. El estímulo de agentes colinérgicos sobre fibras nerviosas preganglionares colinérgicas y otros tejidos nerviosos produce un incremento en la tasa del GMPc y todas las experimentaciones son acordes con la idea de que el GMPc puede mediar la acción post-sináptica de la acetilcolina en las sinapsis colinérgicas muscarínicas. En neuronas del tracto piramidal, el GMPc podría funcionar como un genuino mensajero intracelular de acetilcolina mientras el AMPc lo sería para noradrenalina.
- b. GMPc (71) parece funcionar como un mediador del estímulo de la secreción gástrica, mientras que el AMPc se comporta como un inhibidor que podría actuar por un mecanismo "feed-back" ya que su producción se estimula como consecuencia de una mayor secreción gástrica (72).
- c. Al seguir los niveles de GMPc y AMPc en diferentes situaciones del ciclo cardíaco, siempre existe una divergencia entre sus concentraciones (73).
- d. En la psoriasis, junto a bajos niveles de AMPc existen concentraciones muy elevadas de GMPc lo cual puede poseer relevancia fisiopatológica en cuanto a ser el probable mecanismo de iniciación y/o mantenimiento de la lesión psoriática, siendo quizás el GMPc la señal activa que induce la proliferación celular (7).
- e. El GMPc estimula la síntesis de ADN en linfocitos, mediada por un factor soluble liberado en las células adherentes (75).
- f. En diversos hepatomas, mientras que el AMPc está a niveles semejantes o menores que en células normales, sin embargo hay una mayor capacidad de enlace del GMPc y de su concentración existiendo concordancia entre valores altos de ésta y una mayor velocidad de proliferación celular (76).

(71) T. W. Stone, D. A. Taylor y F. E. Bloom; *Science*, 187, 845-7, 1975.

(72) M. S. Amer; *Amer. J. Dig. Dis.*, 19, 71-74, 1974.

(73) A. Wollenberg, E. B. Babskii et al.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 55, 446, 1973.

(74) J. J. Voorhees, M. Stawiski y E. A. Duell; *Life Sci.*, 13, 639-53, 1973.

(75) T. Diamantstein, A. Ulmer; *Nature*, 256, 418-19, 1975.

(76) M. L. Goldberg, G. C. Burke y M. P. Morris; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 320, 1975.

- g. El tiroides, los iones Ca^{+2} funcionan como moduladores de la concentración de GMPc. En todo caso, los efectos que producen incrementos en el GMPc normalmente producen disminución en el AMPc (77).
- h. El GMPc media la liberación de un factor lisosomal eritropoietico renal, la eritrogenina, que interactúa con un sustrato plasmático para generar la hormona eritropoyetina. El papel del AMPc es participar, posteriormente al GMPc, en el proceso de activación de la eritropoyetina (78).
- i. En el proceso de la visión, el AMPc posee un papel como intermedio de la fotoexcitación. También participa el GMPc y la luz inhibe la guanilato ciclasa y activa la GMPc-fosfodiesterasa retinal (79).
- j. La acción simultánea de las dos subunidades, alta y baja, de la gonadotropina coriónica humana no altera la tasa de AMPc pero sí incrementa la de GMPc y como consecuencia de su efecto sobre esteroidogénesis, se produce un aumento en progesterona (80).
- k. El GMPc posee un efecto diurético, al conseguir la reabsorción tubular de electrolitos (81).
- l. En procarióticos, los efectos del AMPc y GMPc son también a menudo divergentes así como las variaciones de sus concentraciones (82) a pesar de que a diferencia con los eucarióticos existe un solo receptor común para los dos nucleótidos.
- m. A nivel molecular, la fosforibosilpirofosfato sintetasa, que es una enzima clave en la biosíntesis de purinas y pirimidinas se estimula con GMPc 10^{-9}M , por unión alostérica que aumenta la afinidad de la enzima hacia el ATP. Por el contrario el AMPc no tiene efecto por sí solo sobre la enzima y antagoniza al GMPc (83). En otros sistemas procarióticos, el GMPc actúa a nivel transcripcional sobre el promotor del operón, induciendo síntesis de ciertas enzimas.

(77) J. van Sande y C. Decoster y J. E. Dumont; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 168, 1975.

(78) G. M. Rodgers, J. W. Fisher y W. J. George; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 979, 1974.

(79) G. Chader, R. Fletcher, M. Johnson y R. Bensinger; *Exp. Eye Res.*, 18, 509-515, 1974.

(80) Ch. V. Rao y F. Carman; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 54, 744, 1973.
Ch. V. Rao y F. Carman; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 18, 509-515, 1974.

(81) H. Osswald; *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, 284, 207-214, 1974.

(82) T. C. Hwang, V. L. Clark y R. W. Bernlohr; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 58, 707, 1974.

(83) C. D. Green, D. W. Martin; *Cell*, 2, 241, 1974.

11.6. *La teoría del Ying-Yang.*

El concepto clásico del Ying-Yang establece un dualismo generalizado, de modo que para cada punto de estímulo (por ejemplo un nervio, en la práctica de la acupuntura) ha de existir otro punto correspondiente de inhibición o supresión. Por ello, Nelson Goldberg, de la Universidad de Minnesota, para intentar unificar los puntos de vista existentes sobre la acción del GMPc en relación con el AMPc, ha recurrido a la hipótesis del Ying-Yang (84), sobre todo en los tejidos que poseen un control bidireccional, o sea, que responden a señales positivas y negativas. En esta hipótesis se postula que GMPc y AMPc poseerían efectos opuestos para de este modo poder utilizar un excelente control del proceso, ya que simultáneamente quedaría afectado por la disminución de uno de los nucleótidos y el incremento en la concentración del otro. Esto es lo que sucedería en casos como el movimiento de leucocitos (inhibido por AMPc, estimulado por GMPc), la proliferación celular, la transformación viral de las células, la inducción de la respuesta inmunológica, acción del factor nervioso de crecimiento, fenómenos de concentración-relajación, anabolismo y catabolismo del glucógeno, etc.

En cuanto a los sistemas unidireccionales, son susceptibles de un solo tipo de influencia, por ejemplo la síntesis de un determinado metabolito, y en este caso los efectos de los nucleótidos pueden ser o bien similares o bien opuestos.

La hipótesis de Ying-Yang ha servido para desviar la atención desde la consideración de los niveles y acciones del AMPc hasta el concepto relación de nucleótidos cíclicos (AMPc/GMPc.).

11.7. *Otros nucleótidos cíclicos naturales.*

Hasta 1974 se pensaba que los únicos nucleótidos cíclicos presentes en los seres vivos eran el AMPc y GMPs. Sin embargo Bloch (85-86), ha encontrado 3',5'-CMP cíclico en extractos de células leucémicas L-1210, siendo este nucleótido el que inicia el crecimiento de las células "in vitro". Asimismo el CMPc está presente en la orina de pacientes leucémicos y ausente en la de personas normales. Más aún, se ha encontrado CMPc en el hígado normal de rata, existiendo 50-200 veces concentraciones más altas en hígado regenerante. También en hígado de rata se ha encontrado recientemente 3'5'-UMPc, todo lo cual abre nuevas per-

(84) N. D. Goldberg, R. F. O'Dea y M. K. Haddox; Cyclic GMP en "Advances in cyclic nucleotide research". Ed. P. Greengard y G. A. Robinson, Raven Press, N. Y., Vol. 3, pgs. 155-255, 1973.

(85) A. Bloch; Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 210, 1975.

pectivas en esta fascinante y complicada parcela de la regulación de los procesos biológicos.

12. DROGAS Y AMP cíclico.

Dado el amplio espectro de acciones biológicas de los nucleótidos cíclicos es evidente el gran interés en el diseño y hallazgo de fármacos que pueden interferir los sistemas ciclasas y si es posible que puedan regular los niveles adecuados de cada nucleótido cíclico en cada tejido u órgano de interés.

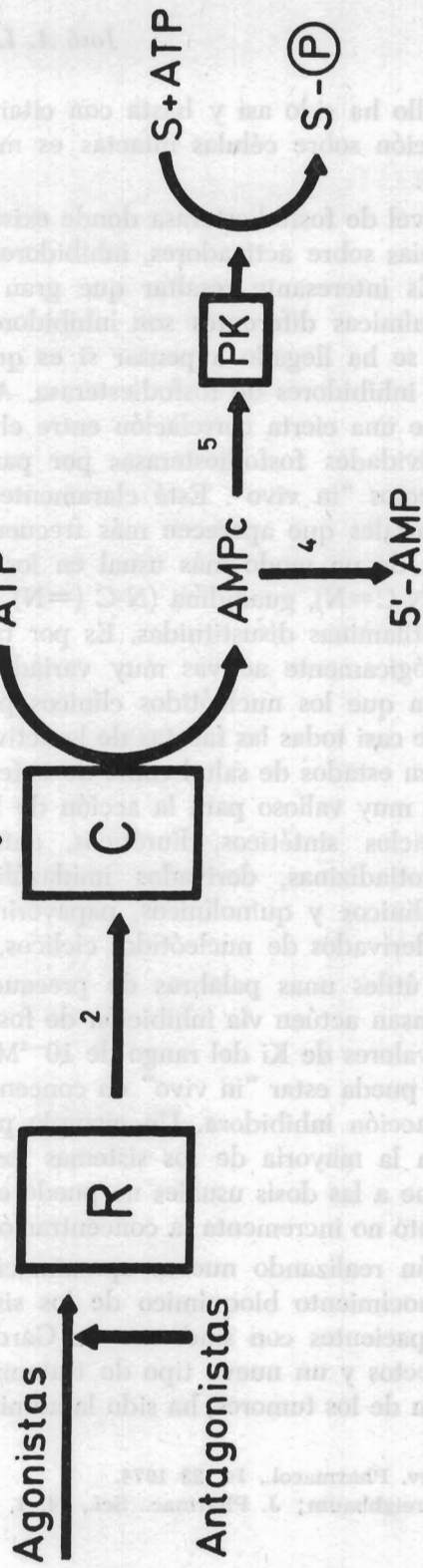
En la Figura 23 se exponen algunos de los lugares posibles de acción de sustancias farmacológicas sobre el sistema adenilato-ciclasa AMPc. Así en corazón, agonistas beta adrenérgicos tales como glucagón e histamina actuarían en el lugar 1 y como consecuencia de la fosforilación de la fosfoproteína tipo fosfoserina, la foslolambdano, se ocasiona un estímulo del transporte de calcio por el retículo sarcoplásmico y de ahí una mayor velocidad de relajación, o sea un acortamiento de la duración del sístole. Por otra parte, en el punto 5, correspondiente a las protein quinasas, es lógico pensar que actúan análogos de nucleótidos cíclicos que, teóricamente, serían de gran importancia enfermedades con formación deficiente de AMPc, tales como fallo cardíaco e hipertensión, o, siguiendo con ejemplos de farmacología cardiovascular (87), en el desarrollo de aterosclerosis que parece relacionada con bajos niveles de AMPc en las células endoteliales arteriales. En la actualidad se conocen algunas decenas de ese tipo de compuestos, que han sido ensayados sobre protein quinasas dependientes de AMPc o de GMPc, y en presencia o ausencia de los moduladores proteínicos de las protein quinasas; los resultados son prometedores ya que algunas de las sustancias probadas son muy efectivas en estimular la enzima e incluso no compiten sino potencian cooperativamente la acción de los nucleótidos cíclicos naturales (88).

Respecto a los análogos del AMPc, otro aspecto interesante es que el AMPc tiene en general un efecto débil en células intactas debido a la impermeabilidad de las membranas celulares hacia los compuestos fosforilados y también debido a su rápida destrucción por las fosfodiesterasas. Por ello, los análogos sintéticos podrían poseer mejor penetración a través de las membranas celulares o una mayor resistencia hacia las fosfo-

(86) A. Bloch, G. Dutschman y R. Mane; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 955-960, 1974.

(87) I. Dye; *Acta Pharmacol et toxicol.*, 36, 31-40, 1975.

(88) F. Kuo, E. Miyamoto y P. Reyes; *Biochem. Pharmacol.*, 23, 2011-2021, 1974.



1. Receptor; 2. Transducción a través de la membrana celular; 3. Subunidad catalítica de adenilato ciclasa; 4. Fostodiesterasa; 5. Proteínquinasa

FIGURA 23. Posibles lugares de acción de sustancias farmacológicas sobre el adenilato ciclasa-AMPc.

diesterasas. Efectivamente, ello ha sido así y basta con citar el ejemplo del dibutiril-AMPc, cuya acción sobre células intactas es mejor, en general, que la del AMPc (89).

En cualquier caso es a nivel de fosfodiesterasa donde existe un mayor cúmulo de datos y experiencias sobre activadores, inhibidores y relación estructura- actividad (90). Es interesante resaltar que gran número de sustancias con estructuras químicas diferentes son inhibidores de fosfodiesterasa de tal modo que se ha llegado a pensar si es que todos los fármacos útiles hoy día son inhibidores de fosfodiesterasa. Aunque realmente ello no es así, sí existe una cierta correlación entre el poder inhibidor "in vitro" de las actividades fosfodiesterasas por parte de gran número de drogas y sus efectos "in vivo". Está claramente establecido que ciertas porciones estructurales que aparecen más frecuentemente en los fármacos están presentes de un modo más usual en los inhibidores. Así sucede con la amidina (N-C=N), guanidina (N-C (=N) -N), amidrazona (N-N-C=N) y 3,4 fenetilaminas disustituidas. Es por tanto razonable que sustancias farmacológicamente activas muy variadas sean inhibidores de fosfodiesterasa ya que los nucleótidos clínicos parecen estar relacionados con el control de casi todas las facetas de la actividad celular y con el metabolismo tanto en estados de salud como de enfermedad, por lo cual deben ser un blanco muy valioso para la acción de los fármacos tan diversos como heterociclos sintéticos, diuréticos, anticoagulantes, agentes psicotrópicos, benzotiadizinas, derivados imidazólicos, aminas adrenérgicas, derivados piridínicos y quinolínicos, papaverina, isoquinoleína, derivados xantínicos, derivados de nucleótidos cíclicos, etc.

De todos modos serían útiles unas palabras de precaución ya que muchos fármacos que se piensan actúen vía inhibición de fosfodiesterasas son inhibidores débiles con valores de K_i del rango de $10^{-3}M$, por lo que es dudoso que el compuesto pueda estar "in vivo" en concentraciones suficientes para expresar esa acción inhibidora. Un ejemplo popular es la teofilina, con K_i $10^{-3}M$ en la mayoría de los sistemas fosfodiesterasa, por lo cual es casi seguro que a las dosis usuales no puede ejercer efecto inhibidor "in vivo" y por tanto no incrementa la concentración del AMPc.

En la actualidad se están realizando nuevas aproximaciones experimentales basadas en el conocimiento bioquímico de los sistemas ciclasas. Así el tratamiento de pacientes con síndrome de Gardner es poco satisfactorio en algunos aspectos y un nuevo tipo de tratamiento que ya ha tenido éxito en la remisión de los tumores, ha sido la administración de

(89) T. Posternak; *Ann. Rev. Pharmacol.*, 14, 23 1974.

(90) M. S. Amer y W. E. Kreighbaum; *J. Pharmac. Sci.*, 64, 1, 1975.

Δ^1 -testololactona (91) que actúa sobre el metabolismo del estradiol consiguiendo su acumulación en las células tumorales y el estradiol es un potente inhibidor de la AMPc-fosfodiesterasa, por lo que la consecuencia final es el aumento en AMPc.

En otras ocasiones ciertas terapias pueden incidir desagradablemente sobre aspectos no sospechados previamente. Así parece suceder con diversos tipos de diuréticos mercuriales que inhiben la fosfodiesterasa dependiente de AMPc y los altos niveles de AMPc resultante pueden provocar arritmias cardíacas ya que la regulación cardíaca depende muy estrechamente del sistema adenilato ciclasa-AMPc.

Incluso sustancias tan usadas como aspirina pueden ejercer su acción a través del sistema adenilciclasa. En efecto la aspirina estimula la actividad adenilciclasa de mucosa gástrica de ratas tras administración oral. Como ello significa incremento en AMPc, se traduce en una inhibición de la secreción gástrica (ácida) y ello explicaría la hipoacidez comprobada tras la administración de aspirina.

13. CONCLUSION

Hemos comprobado, a lo largo de esta exposición, el papel importantísimo que el AMPc desempeña en multitud de procesos fisiológicos y cómo otros nuevos nucleótidos cíclicos también parecen participar de un modo notable, lo cual abre nuevas perspectivas en su investigación. Incluso se ha llegado a decir que aquellas personas que piensan con nostalgia y desilusión en el fracaso de la teoría del vitalismo, pueden encontrar en cierto modo, una sustitución en el ubicuo AMPc presente prácticamente en todos los procesos que caracterizan la vida.

Por último hemos de volver a resaltar el enriquecimiento que se proporcionan mutuamente las investigaciones básicas y clínicas en Medicina. Como consecuencia de estudios de tipo clínico se abordó la problemática científica básica de los nucleótidos cíclicos y gracias a los actuales conocimientos éstos pueden ser muy útiles para ayudar a resolver los graves problemas clínicos que la Medicina tiene planteados hoy día.

(91) W. R. Waddell; *Ann. of Surg* 181, 299, 1975.