

EL MARCAPASO DEL CORAZÓN PUEDE SER MODULADO POR LA ACETILCOLINA MEDIANTE UNA VÍA DELIMITADA A LA MEMBRANA*

**José María Farías¹, Dieter Mascher¹, María Cristina Paredes-Carbajal¹,
Patricia Victoria Torres-Durán², Marco Antonio Juárez-Oropeza²**

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México. ² Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Distrito Federal, México. Correo E: jomafa@liceaga.facmed.unam.mx

RESUMEN

La acetilcolina es un neurotransmisor liberado por el nervio vago que se une al receptor muscarínico M₂ en las células marcapaso del corazón. Esta unión ligando-receptor activa una proteína G de la cual sale el dímero beta-gamma. Este dímero se mantiene anclado a la cara interna de la membrana plasmática, ejerciendo una acción rápida, directa, delimitada a la membrana y que no requiere fosforilación sobre los canales de K⁺. Estos canales, inicialmente llamados K(Ach), hacen que sea más lenta la despolarización de la célula marcapaso y disminuya la frecuencia cardíaca. Además, la acetilcolina puede iniciar y mantener mecanismos de modulación lentos, con mensajeros intracelulares solubles, activación de cinasas y fosforilación. Se revisó también la acción adrenérgica complementaria y antagonista a la respuesta colinérgica.

ABSTRACT

Acetylcholine is a neurotransmitter released by the vagus nerve that binds to the muscarinic M₂ receptor of heart pacemaker cells. Ligand-receptor binding releases a beta-gamma dimer from the G protein. This dimer remains anchored to the inner surface of the plasma membrane, exerting a fast, direct, membrane delimited action that does not require phosphorylation of K⁺ channels. These channels, initially called K (Ach), produce a slow depolarization of the pacemaker cell, decreasing the heart rate. In addition, acetylcholine initiates and maintains slow modulation mechanisms that require soluble intracellular messengers, activation of kinases and phosphorylation. We also review the adrenergic action, complementary and antagonistic to cholinergic response.

INTRODUCCIÓN

La contracción rítmica del corazón es el sustrato básico del mecanismo de bombeo, el cual hace que la sangre circule por todo el organismo llevando nutrientes y recogiendo desechos. La contracción rítmica del corazón es un proceso automático que puede incrementarse, tanto en frecuencia como en intensidad, por la noradrenalina y/o la adrenalina. La noradrenalina es un neurotransmisor liberado por los nervios simpáticos. La adrenalina es una hormona que

PALABRAS CLAVE:

Canales de potasio (K⁺), células marcapaso, efecto de la acetilcolina, modulación por proteínas G.

KEY WORDS:

G-protein modulation, pacemaker cells, potassium channels (K⁺), Acetylcholine effect.

juega un papel sinérgico con la noradrenalina, y proviene principalmente de la médula suprarrenal. El proceso contrario a la estimulación adrenérgica, la estimulación colinérgica, está mediada, en el corazón, por el nervio neumogástrico. Este nervio corresponde al décimo par craneal y es comúnmente llamado nervio vago. La acción del neurotransmisor acetilcolina, liberado por el nervio vago en el corazón, frena el ritmo cardíaco y debilita la fuerza de la contracción. El objetivo de este trabajo es revisar un mecanismo fisiológico particular, delimitado a la membrana plasmática,

desencadenado por la acetilcolina y llevado a cabo por uno de los componentes de las proteínas G, que realiza la transducción de la señal externa con el canal iónico.

COMPONENTES DEL SISTEMA TRANSDUCTOR

Históricamente, las proteínas G recibieron el nombre de proteínas N, debido a su capacidad de unir nucleótidos; después de conocer que específicamente unían nucleótidos de guanina, se cambió la nomenclatura a proteínas G. Más tarde se identificaron varias proteínas G, mismas que en la actualidad han constituido una superfamilia. Esta familia comprende dos grandes grupos, las monoméricas y las heterotriméricas. Las monoméricas no están asociadas a la membrana y se encuentran en el citoplasma o en el núcleo. Puesto que las proteínas G heterotriméricas son las que participan en la transducción de señales acopladas a receptor y la formación de segundos mensajeros, se describirán brevemente estas proteínas. Las proteínas G heterotriméricas están formadas por las subunidades α , β y γ ($G\alpha\beta\gamma$), de las que se conocen múltiples isoformas; no obstante, es en la subunidad α en donde reside la actividad de GTPasa. Las subunidades α y γ pueden mantenerse ancladas a la cara interna de la membrana plasmática debido a modificaciones post-traduccionales, a saber: α se acila con ácido mirístico o con ácido palmítico, mientras que γ se derivatiza con farnesilo o geranilgeranilo. Existen diferentes familias de proteínas G heterotriméricas que se clasifican con base en la subunidad α , misma que define el tipo de efecto, o segundo mensajero que regulan. Con base en lo anterior, existen las proteínas $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_q$, $G\alpha_T$, $G\alpha_{olf}$, $G\alpha_{gust}$, entre otras (Tablas 1 y 2). Cuando la proteína $G\alpha\beta\gamma$ se activa por la interacción con el complejo ligando-receptor, $G\alpha$ une al GTP y se separa del dímero $G\beta\gamma$. En algunos sistemas transductores, el efecto es $G\alpha$, mientras que en otros es el dímero $G\beta\gamma$. La subunidad $G\alpha$ hidroliza al GTP, mantiene al GDP unido y entonces se reasocia con el dímero $G\beta\gamma$ para regenerar el heterotrímero inactivo $G\alpha\beta\gamma$, reiniciando el ciclo.

Básicamente, este sistema transductor de señales consta de tres componentes:

1. El receptor de la membrana plasmática con siete segmentos transmembranales llamado receptor 7TM, serpentin o receptor metabotrópico, o más recientemente llamado, receptor asociado a proteínas G (GPCR, G protein coupled receptor); 2. Una enzima de membrana plasmática que genera intracelularmente el segundo mensajero, y finalmente, 3. Una proteína G heterotrimérica que se disocia del receptor GPCR ocupado y activa a la

enzima o proteína efectora que formará el segundo mensajero. Existen componentes adicionales que participan en la regulación del sistema transductor, tales como el factor intercambiador del nucleótido de guanina (GEF, por sus siglas en inglés), que facilita el intercambio de GDP por GTP en la proteína $G\alpha\beta\gamma$, por lo cual la activa. La proteína aceleradora de la actividad GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés) favorece la hidrólisis del enlace fosfodiéster del GTP a GDP, por lo cual inactiva a la proteína G. A estos reguladores también se les conoce como RGS (por las siglas en Inglés, regulator of G-protein signaling), mismas que se añaden a una lista creciente de reguladores identificados.

Los receptores GPCRs comprenden una multitud de proteínas, y se reconocen gran variedad de ligandos, tales como los neurotransmisores, las feromonas, las hormonas, los odorívectores y una gran variedad de péptidos y proteínas. Los GPCRs se clasifican en seis grupos de acuerdo con su homología funcional y estructural:

1. Receptores semejantes a rodopsina (clase A o clase 1), 2. Receptores de la familia de la secretina (clase B o clase 2), 3. Receptor metabotrópico del glutamato y de las feromonas (clase C o clase 3), 4. Receptores fúngicos de las feromonas (clase D o clase 4), 5. Receptores del AMPc (clase E o clase 5) y 6. Receptores de la familia Frizzled/Smoothened (clase F o clase 6) (1).

En los vertebrados solamente se han encontrado las tres primeras clases, la familia A es el grupo más grande, que comprende al receptor para la luz (rodopsina), para la adrenalina (receptores adrenérgicos), para otras moléculas pequeñas (aminas biogénicas, quimiocinas, prostanoides, neuropéptidos, cannabinoides y opioides), para la dopamina, la serotonina, la acetilcolina (muscarínicos, odorívectores, péptidos, tales como la bradicinina, la angiotensina, la somatostatina y hormonas glicoprotéicas como la FSH, la LH, y la TSH, que en total suman más de 670 miembros en el ser humano (2). Los receptores de la clase B comprenden aproximadamente 25 miembros, que incluyen a la familia de las hormonas peptídicas gastrointestinales tales como la secretina, el glucagón, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), además, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (ghrelina), la hormona liberadora de la cortico-tropina, la calcitonina y la hormona paratiroides. La familia C es la más pequeña e incluye a la familia del receptor metabotrópico del glutamato, el receptor tipo B del GABA, el receptor sensor del calcio, así como algunos receptores del gusto (3-6).

En lo que se refiere a las proteínas G, tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ tienen, indepen-

TABLA 1
CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G

Clase G α	Proteínas Efectoras Asociadas	Efectos	Ejemplos de receptores
Estimuladoras de la adenilil ciclase $G\alpha_s$ ₍₁₋₄₎ , $G\alpha_{olf}$	Adenilil ciclase Canal de calcio Cinasa de tiro-sina c-Src	Aumento de AMPc Incremento de la $[Ca^{2+}]_i$	Adrenalina (β_2 , β_3 , etc), glucagón (GLP-1), vasopresina (V_2), odorívectores
Inhibidoras de la adenilil ciclase $G\alpha_i$ ₍₁₋₃₎ , $G\alpha_z$, $G\alpha_o$	Adenilil ciclase, Canal de K ⁺	Disminución de AMPc Cambios en el potencial de membrana	Adrenalina (α_1), acetilcolina (M ₂ , M ₄), serotonina (5-HT ₁), glutamato (mGluR ₂₋₄ , mGluR ₆), orexinas, ghrelina, aminas traza (octopamina, tiramina), GABA (GABA _B)
Estimuladoras de la Fosfolipasa C $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14-16}$	Fosfolipasa C β	Aumento de IP ₃ , DAG	Adrenalina (α_2), acetilcolina (M ₁ , M ₃ , M ₅), serotonina (5-HT ₂ , 5-HT ₄₋₇), glutamato (mGluR ₁ , mGluR ₅)
$G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$	LARGE RhoGEF y otras proteínas GEF, ERK5	Vías de señalización por proteínas Rho. Aumento del antiportador Na ⁺ /H ⁺ . Transcripción de genes y regulación del crecimiento celular. Efectos oncogénicos y de proliferación celular	Angiotensina (AT ₁), trombina, esfingosina-1-fosfato (S1P ₂ , S1P ₃), ácido lisofosfatídico (LPA), serotonina (5-HT ₄), Tromboxano A ₂
Estimuladoras de la Fosfodiesterasa de GMPC $G\alpha_t$ (transducina) $G\alpha_{gust}$ (gustducina)	fosfodiesterasa de GMPC	Disminución de GMPC	Fotones (rodopsina de células fotorreceptoras) Sabores amargo y dulce en neuronas de papillas gustativas

SIGNIFICADO DE LAS ABREVIATURAS

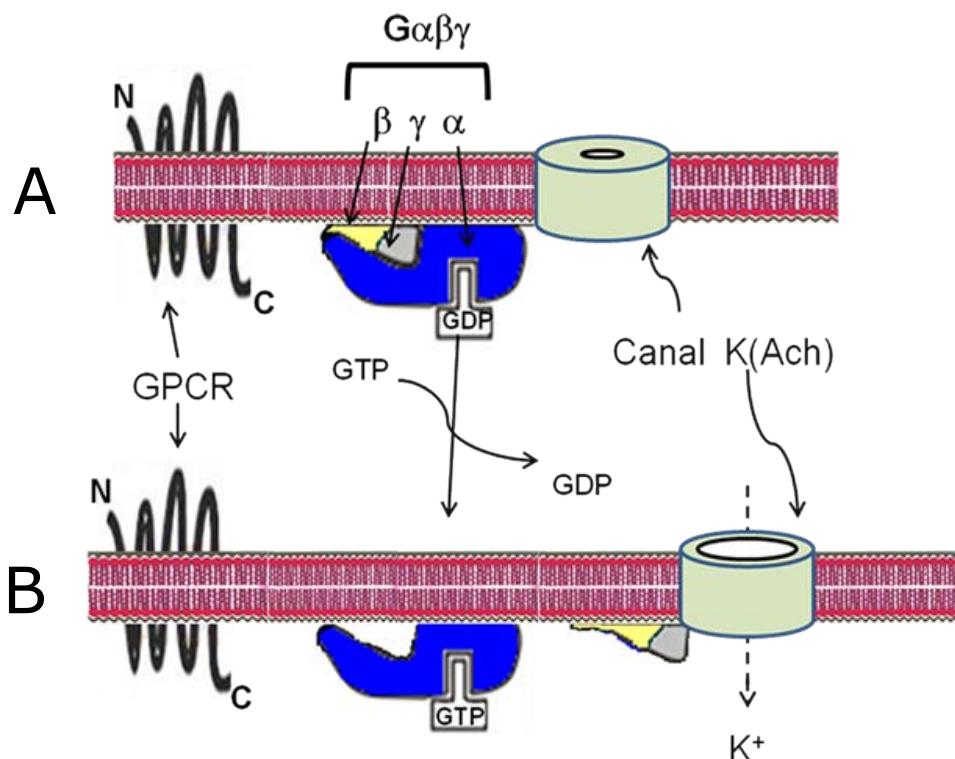
GIRK (rectificadores entrantes acoplados a proteínas G), **GRKs** (cinasa de receptor asociado a proteínas G). **c-Src** (proteína citoplasmática con actividad de cinasa de residuos de tirosina, y catalogada como proto-oncogen, su nombre deriva de la abreviatura en inglés de Sarcoma, Src, y de su origen celular

en contraposición del derivado del virus del sarcoma), **VOCC** (canales de calcio operados por voltaje), **LARGE** (factor Rho de intercambio de nucleótidos de guanina, asociado a leucemia), **ERK5** (cinasa 5 regulada por señales extracelulares), **RhoGEF** (factor Rho de intercambio de nucleótidos de guanina).

TABLA 2
CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G

Clase G $\beta\gamma$	Proteínas efectoras asociadas	Efectos	Ejemplos de receptores
$G\beta\gamma$	Kir3.1-3.4(K(Ach) o GIRK GRKs, Adenilil ciclase, isoformas I y II Fosfolipasa C (isoformas β_1 a β_3), Fosfatidil inositol-3 cinasa (PI ₃ K, isoforma γ), VOCC	Cambios en el potencial de membrana Aumento de AMPc, Aumento de IP ₃ , DAG	Acetilcolina (M ₂), Histamina (H ₃ R)

Figura 1. Ilustración gráfica del mecanismo delimitado a la membrana. A: Cuando el ligando no está unido a su receptor, el canal no es afectado por las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G. B: Cuando el ligando se une a su receptor (en el presente caso acetilcolina y receptor M_2), las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G llegan al canal mediante un mecanismo delimitado a la membrana. Figura modificada de Tedford y Zamponi, 2006 (29).



dientemente, la capacidad de activar o inhibir la formación de diferentes efectores, lo que indica la gran complejidad en las vías de señalización (7-9). En general, las proteínas G heterotriméricas se han agrupado en subfamilias teniendo en cuenta la subunidad α o la $\beta\gamma$, que se definen de acuerdo al tipo de actividad, como se presenta en las Tablas 1 y 2.

LA ACETILCOLINA PUEDE INICIAR LA ACTIVACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G MEDIANTE RECEPTORES MUSCARÍNICOS

La acetilcolina es uno de los más abundantes neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico, y el primero en haber sido identificado como una sustancia con funciones de neurotransmisor. Este descubrimiento, realizado por Otto Loewi, le ameritó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1936. La acetilcolina es sintetizada a partir de colina y acetil-CoA mediante la enzima colina acetiltransferasa, la primera derivada del metabolismo de la fosfatidilcolina y/o por la metilación de la etanolamina. Los receptores a la acetilcolina son los nicotínicos (ionotrópicos) y los muscarínicos (GPCR metabotrópicos). En el músculo esquelético de las personas adultas, la acetilcolina se une a la subunidad alfa del canal nicotínico, que son dos de las cinco subunidades que forman el poro de este canal. A las otras tres se les denomina subunidades beta. Por otra parte, en células de músculo cardíaco y liso, la acetilcolina se une a proteínas

$7M$, que no funcionan como canales, sino que son miembros típicos de la superfamilia GPCR clase A. Se conocen cinco subtipos de estos receptores muscarínicos, denominados M_1 a M_5 . Los M_2 y M_4 muestran selectividad por la familia G_i , mientras que los M_1 , M_3 y M_5 , por la G_q (10).

Uno de los mecanismos fisiológicos de la acetilcolina es la regulación de la frecuencia cardiaca, mediante la movilización delimitada a la cara interna de la membrana plasmática del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G. Este dímero, realiza la transducción de la unión específica del ligando con su receptor en el plano de la membrana, gracias a su proximidad con el canal iónico o con las enzimas unidas a la membrana plasmática. Esto lo puede realizar porque su subunidad γ se mantiene unida a la cara interna de la membrana (11). También, el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G puede activar enzimas como la adenilil ciclase y las fosfolipasas, que generan segundos mensajeros difusibles, que a su vez activan a las cinasas respectivas, con el fin de lograr la fosforilación de los canales iónicos y así modular su función.

CÉLULAS MARCAPASO, RECEPTORES Y PROTEÍNAS G

A diferencia de la adrenalina, que puede circular libremente en el torrente sanguíneo, la acetilcolina no lo puede hacer debido a que existen colinesteras tanto séricas como del espacio sináptico, que la degradan. El nervio vago inerva al corazón y a muchos otros órganos, siendo uno de los com-

ponentes principales de la división parasimpática del sistema nervioso autónomo. La acetilcolina liberada de las terminaciones nerviosas se une a receptores específicos que se encuentran en la membrana de las células del corazón que forman parte del mecanismo generador del ritmo cardíaco, llamadas células marcapaso. También la noradrenalina, liberada por neuronas de la división simpática, se une a receptores específicos sobre las células marcapaso del corazón, pero con efectos opuestos a los de la acetilcolina.

Las células marcapaso del corazón se definen así porque son las células que presentan la mayor frecuencia de despolarización en este órgano. Esto da inicio a los potenciales de acción, los cuales se propagan a las células adyacentes, induciendo en forma coordinada las contracciones de los músculos de las paredes de las cavidades del corazón. La frecuencia a la que se activan las células marcapaso y la fuerza de la contracción pueden ser moduladas por señales químicas, neurotransmisores u hormonas, que llegan a receptores GPCR en la membrana celular. Estos receptores atraviesan siete veces la membrana plasmática, con su extremo N-terminal fuera de la célula y su extremo C-terminal en el interior de ésta (Fig. 1). Cuando el neurotransmisor se une al receptor, para que la unión sea de alta afinidad, el receptor tiene que estar al mismo tiempo unido a una proteína G, la cual inicia alguna de las vías de señalización intracelular (12). El ligando, una vez habiendo dejado activada la cascada de señalización intracelular mediada por los componentes de la proteína G, se puede separar del receptor con el fin de activar a otros receptores. Una de las características de la proteína G es que puede encontrarse anclada a la superficie intracelular de la membrana plasmática, lo cual le permite mantenerse cerca tanto del receptor como de las proteínas efectoras que se encuentran integradas a la membrana plasmática. Si la proteína G no está en ese instante unida al receptor, entonces la unión del ligando con este receptor es de baja afinidad, y esta unión de baja afinidad no puede iniciar alguna cascada de señalización intracelular, precisamente porque la proteína G no estaría haciendo contacto con el receptor en ese momento.

PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS TANTO EN MECANISMOS QUE REQUIEREN DE LA FOSFORILACIÓN COMO EN MECANISMOS QUE NO LA REQUIEREN

Las proteínas G tienen tres subunidades ($G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$). En la subunidad $G\alpha$ reside la actividad de GTPasa. Los otros dos componentes forman el dí-

mero $\beta\gamma$ de la proteína G ($G\beta\gamma$), que lleva a cabo - entre otras - un tipo de señalización que, por el hecho de no ser mediada por un segundo mensajero difusible, en el sentido de que pueda desprenderse de la membrana, se le denomina señalización "delimitada a la membrana" y no requiere fosforilación. En esta forma libre, este dímero $G\beta\gamma$ se desplaza un corto trayecto anclado a la superficie intracelular de la membrana plasmática para unirse a un canal iónico determinado. Es importante mencionar que este sitio en donde se une el dímero $G\beta\gamma$ al canal iónico, puede ser fosforilado por un mecanismo en paralelo. Este doble mecanismo determina que en los canales iónicos pueda ocurrir un antagonismo de la modulación de la apertura del canal debido a una competencia entre la acción que ejercen directamente las subunidades $G\beta\gamma$ y la acción fisiológica de la fosforilación (13).

EL RECEPTOR MUSCARÍNICO PUEDE ACTIVAR MENSAJEROS DIFUSIBLES Y UN MECANISMO DELIMITADO A LA MEMBRANA

Al receptor GPCR para la acetilcolina expresado en el corazón se le ha clasificado dentro de la familia de receptores metabotrópicos colinérgicos muscarínicos, debido a que la muscarina es su agonista específico. La atropina es considerada como su antagonista más común. Los receptores muscarínicos clasificados como M_2 se han encontrado en todo tipo de células cardíacas (12). Dos acciones muscarínicas de la acetilcolina en el corazón han sido estudiadas con mucho interés: la disminución de una corriente de Ca^{2+} sensible al voltaje, y la apertura de un canal de K^+ rectificador entrante. El primer mecanismo correspondiente a la reducción de la corriente de Ca^{2+} es mediado por un mecanismo que utiliza un segundo mensajero difusible, es decir que no está delimitado a la membrana plasmática, y que por lo tanto puede moverse dentro del citoplasma de la célula. En cambio, el segundo mecanismo, el correspondiente a la apertura del canal de K^+ , es debido a un mecanismo delimitado a la membrana. El primero requiere fosforilación del canal de Ca^{2+} , en cambio en el segundo no se requiere que el canal de K^+ sea fosforilado.

REDUCCIÓN DE LA CORRIENTE DE CALCIO POR LA ACETILCOLINA MEDIANTE ACTIVACIÓN DE CINASAS

La acetilcolina puede disminuir la corriente de Ca^{2+} tipo L en las células del corazón, pero solamente si previamente esta corriente ha sido aumentada mediante la acción de los agonistas adrenérgicos sobre el receptor adrenérgico β (14,15).

Los principales receptores adrenérgicos funcionales son el α_1 , el α_2 y los β . En general podemos decir que, por una parte, los receptores adrenérgicos α_1 incrementan transitoriamente la concentración intracelular de Ca^{2+} , de diacilglicerol (DAG) y de trifosfato de inositol (IP_3), que son los segundos mensajeros de esta vía de señalización intracelular (16). Esto se logra por la activación temporal de la fosfolipasa C (PLC), que convierte a determinados fosfoinosítidos de la membrana en DAG e IP_3 . Este último abre un canal iónico liberador de Ca^{2+} , denominado receptor de la ryanodina, que está localizado en el retículo sarcoplasmico. Tanto el Ca^{2+} como el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC) que fosforila distintas proteínas, entre las que se encuentran los canales iónicos.

Por otra parte, tenemos una vía de señalización distinta, que es la del AMP-cíclico (AMPc). Los receptores adrenérgicos β , mediante una proteína Gs, activan a la adenilil ciclase, que es la enzima que tiene como sustrato al ATP para convertirlo en el AMPc, con lo cual se incrementa la concentración de este mensajero intracelular. El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA). Esta acción de los receptores adrenérgicos β puede ser antagonizada tanto por los receptores adrenérgicos α_2 como por los receptores colinérgicos muscarínicos M_2 . Este mecanismo inhibitorio se realiza mediante una proteína Gi y que por lo tanto, disminuye la concentración intracelular del AMPc. Estas bajas concentraciones de AMPc reducen la actividad de la PKA dependiente de este mensajero, con lo cual se reduce la fosforilación y el estado abierto de los canales de Ca^{2+} . Los receptores α_2 y M_2 también incrementan la apertura de canales de K^+ , lo cual complementa la acción inhibitoria sobre los canales de Ca^{2+} , produciendo así una disminución de la actividad celular. Junto con estas vías de señalizaciones lentas, tenemos además a la rápida, que es el mecanismo delimitado a la membrana, y que no requiere fosforilación. En resumen, podemos decir que la activación del receptor α_1 incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular, a diferencia del receptor β que incrementa el AMPc. Esta activación β que aumenta el AMPc, se ve contrarrestada tanto por los receptores α_2 como por los receptores M_2 , que lo disminuyen. Y a esto se añade que tanto el receptor α_2 como el receptor M_2 pueden activar el mecanismo delimitado a la membrana (12).

Puesto que el efecto de la acetilcolina está mediado por una disminución de la formación de AMPc, la acetilcolina no tiene efecto cuando el aumento de la corriente de Ca^{2+} es inducido por la aplicación intracelular del AMPc o de la subunidad catalítica de la PKA, la cual fosforila al canal de Ca^{2+} . Por el contrario, si disminuye la concentra-

ción intracelular del AMPc, también disminuirá la activación de la PKA, lo cual a su vez hará que se pierda la fosforilación del canal, y en esta forma la corriente de Ca^{2+} se reduce a los niveles previos a la estimulación adrenérgica β . El resultado es una reducción de la entrada de Ca^{2+} durante cada contracción del corazón, lo cual hace que la fuerza de la contracción se vea debilitada (17,18).

CORRIENTES DE POTASIO QUE RALENTIZAN LA FRECUENCIA CARDIACA ACTIVADAS POR ACETILCOLINA MEDIANTE UN MECANISMO QUE NO REQUIERE DE LA FOSFORILACIÓN DEL CANAL IÓNICO

A diferencia de los canales de Na^+ o de Ca^{2+} , que al abrirse despolarizan a la célula, la apertura de los canales de K^+ la mantienen polarizada o, incluso pueden inducir un estado de hiperpolarización. Todas las células tienen una polaridad eléctrica transmembranal, a la cual se le ha llamado potencial de membrana en reposo, y su valor se puede calcular mediante la ecuación de Nernst si se conocen los valores de las concentraciones de K^+ que se encuentran fuera y dentro de la célula, y se asume que en reposo la membrana es selectivamente permeable al ion K^+ . La polaridad eléctrica de la célula se mantiene mientras estén abiertos los canales de K^+ , y esta condición tiene que ser contrarrestada en las células marcapaso. A las células con actividad eléctrica espontánea rítmica se les llama marcapaso, y se caracterizan por tener un potencial de membrana que disminuye espontáneamente hasta el nivel denominado umbral en el que se desencadena el potencial de acción. Se conoce como potencial umbral al valor que hace que se abran los canales cuya apertura depende del voltaje. Las células marcapaso del nodo sinusal no tienen canales de Na^+ , y su potencial de acción se genera al activarse las compuertas sensibles al voltaje de los canales de Ca^{2+} . Para que se active la corriente despolarizante de Ca^{2+} se requiere que esté ausente o disminuida la corriente polarizante de K^+ . Cuando se termina el potencial de acción, la polaridad de la célula recupera la condición inicial (repolarización) gracias a la apertura de los canales de K^+ , y empieza un nuevo ciclo al ocurrir nuevamente la despolarización espontánea que se denomina potencial marcapaso.

Con la estimulación del nervio vago, la membrana de la célula marcapaso se hiperpolariza debido a un aumento en la conductancia al K^+ . Esto hace que la despolarización marcapaso se haga más lenta. El efecto de la activación vagal puede ser de dos tipos, lento o rápido. Lento, porque la activación de los receptores M_2 disminuye la concentración de

AMPc intracelular. Rápido, porque las subunidades G $\beta\gamma$ ejercen un efecto directo sobre un canal de K $^{+}$ presente en las células marcapaso del corazón. Estos canales de K $^{+}$ fueron inicialmente llamados canales K(Ach) por los fisiólogos (19,20), pero actualmente también son llamados canales GIRK (rectificadores entrantes acoplados a proteínas G) o canales Kir3 (12). En las células marcapaso del corazón la apertura del canal K(Ach) es uno de los factores que contribuyen a disminuir la frecuencia cardíaca. Por el contrario, la estimulación de los nervios simpáticos cardiacos determina que el potencial de membrana disminuya con más rapidez (despolarización) y se generen los potenciales de acción con una mayor frecuencia, lo cual se debe a la activación de los receptores adrenérgicos α_1 que incrementan la PLC, y a los receptores adrenérgicos β que, al aumentar el AMPc facilitan la apertura de los canales de Ca $^{2+}$ (17,18).

DILUCIDANDO EL MECANISMO DELIMITADO A LA MEMBRANA

En los experimentos electrofisiológicos de fijación de voltaje en micro-áreas de membrana celular (en inglés llamados de "patch-clamp"), se le suele llamar "parche" al área de membrana que queda atrapada y aislada debajo de la punta de la micropipeta de registro. Este parche contiene unos cuantos canales iónicos rodeados por el círculo que forma el borde pulido de la punta de la micropipeta. Bajo estas condiciones, cuando se agrega acetilcolina a la solución que baña a la célula, la acetilcolina no puede entrar en contacto con la membrana del parche, y no se observan cambios en los canales del parche. Pero, cuando la acetilcolina es añadida a la solución contenida en el interior de la pipeta, la cual está en contacto con la membrana atrapada en el interior del parche, entonces se presenta activación de corrientes iónicas por la apertura de los canales. Esto delimita la localización del receptor dentro de la membrana del parche.

Aquí es notable el hallazgo de que la respuesta no es tan rápida como en los receptores ionotrópicos, en los cuales el receptor y el poro del canal corresponden a la misma proteína. Así que se trata de un receptor formado por una proteína diferente de la que forma el canal, pero con una vía de comunicación próxima, rápida y asociada a la membrana, que no requiere fosforilación, pero sí de la proteína G, porque el dímero G $\beta\gamma$ no puede atravesar el círculo formado por el borde pulido de la micropipeta adherido a la membrana. Solamente si pudiera salirse de la membrana podría atravesar ese obstáculo (Fig. 2).

En estas condiciones cuando el agonista, el re-

ceptor y el canal iónico están dentro de la pipeta puede haber respuesta. Por eso se requiere que el agonista sea colocado dentro de la pipeta, para que sea posible la comunicación entre el receptor y el canal mediante las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G que se mueven ancladas al lado intracelular de la membrana.

Lo importante en este experimento es comprender que el dímero G $\beta\gamma$, al tener que desplazarse anclado a la membrana, no puede traspasar el obstáculo circular constituido por la protuberancia que forma el borde de la pipeta al unirse con la membrana. El borde de la pipeta, formado por un vidrio que es un líquido de alta viscosidad, se fusiona con la membrana, que también es un líquido pero más fluido, estableciendo un sello de alta resistencia eléctrica, el cual es indispensable para poder realizar este tipo de registros electrofisiológicos.

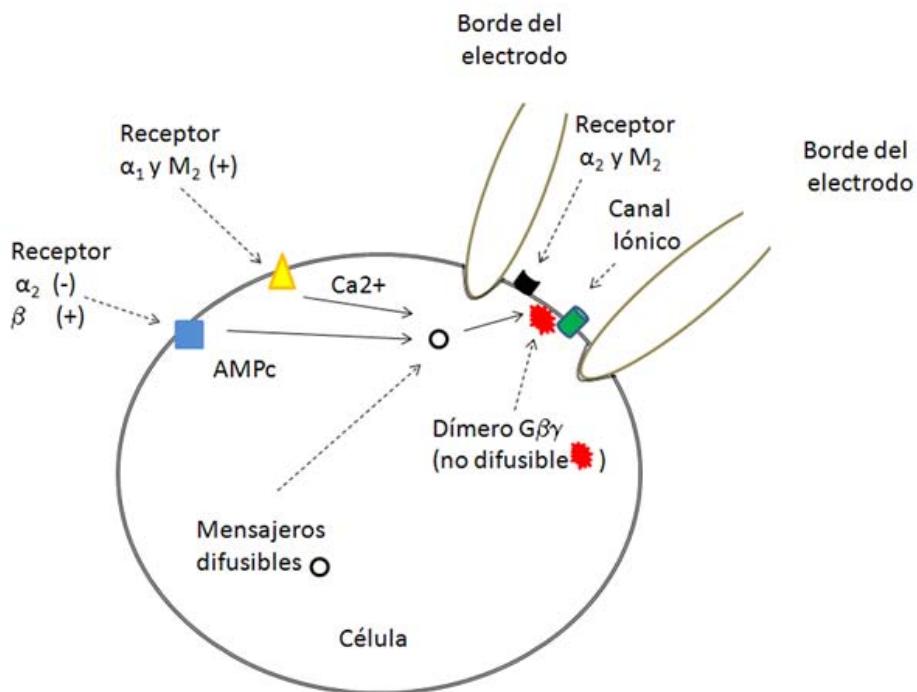
La cercanía del receptor molecular con el canal iónico y una porción de la membrana plasmática sin obstáculos es la condición óptima para que la proteína G, cuya acción principal es la de llevar a cabo la transducción de la señal, pueda contactar fácilmente a la proteína blanco (canal iónico) y ejercer su acción (21).

¿QUÉ TAN RÁPIDA ES LA RESPUESTA DE LAS CÉLULAS MARCAPASO A LA ACETILCOLINA?

Tan rápida que puede modular la frecuencia cardíaca mediante la velocidad de los movimientos de la ventilación pulmonar. La arritmia sinusal del corazón debida a los movimientos respiratorios es un fenómeno normal que se debe a las fluctuaciones en la señal parasimpática que llega al corazón. Durante la inspiración, los impulsos del nervio vago provenientes de los receptores de estiramiento de los pulmones inhiben al área inhibidora cardiaca del bulbo raquídeo. Al reducirse la descarga tónica del nervio vago que mantiene la frecuencia cardiaca baja, se eleva la frecuencia cardiaca durante cada movimiento respiratorio.

Este efecto del nervio vago, y por lo tanto de la acetilcolina, es una de las respuestas más rápidas observadas en receptores acoplados a proteínas G. También tiene una reversibilidad rápida, de 300 ms, después de que la acetilcolina es removida. Esto difiere notablemente de la respuesta clásica de los receptores metabotrópicos que se conocen como de respuesta lenta. En éstos, el efecto se instala con lentitud y al quitar el estímulo el efecto se desvanece lentamente. También difiere de la respuesta casi inmediata de los receptores ionotrópicos. Un ejemplo de éstos son los receptores nicotínicos, que se encuentran en la membrana de

Figura 1. Ilustración que compara al mecanismo delimitado a la membrana con el mecanismo que utiliza un segundo mensajero difusible. El borde circular del electrodo de vidrio pulido forma un sello de alta resistencia con la membrana, que aísla a los componentes que quedan dentro. Cuando el neurotransmisor se aplica en la solución que está dentro de la pipeta se observa respuesta por la vía delimitada a la membrana, pero esto no sucede si el agonista es aplicado en el baño. Esto último solamente puede generar una respuesta muy lenta que depende de la activación de cinasas y de la fosforilación.



la placa neuromuscular y responden a la acetilcolina liberada por parte de las neuronas motoras del sistema somático voluntario. En los receptores ionotrópicos, el receptor es un canal, de tal forma que la comunicación es más rápida que la de los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Uno de los primeros argumentos esgrimidos para descartar que esta acción de modulación local no sea igual a la de los canales ionotrópicos es que la latencia de respuesta no es tan breve. En el caso del mecanismo delimitado a la membrana, la comunicación entre el receptor y el canal se realiza mediante las subunidades G $\beta\gamma$ (12).

HERRAMIENTAS Y ESTRATEGIAS UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA VÍA DELIMITADA A LA MEMBRANA QUE LLEVA LA SEÑAL

Se han desarrollado sustancias análogas al GTP, excepto que no se hidrolizan y por lo tanto, no puede darse la conversión a GDP (22,23). La GTPasa de la subunidad G α no tiene efectos sobre estas sustancias equivalentes al GTP. Uno de estos análogos no hidrolizables es el GTP γ S. Cuando se aplica intracelularmente este compuesto, el canal de potasio K(Ach) se mantiene abierto. Esto sucede a la par de otros efectos, porque permanecen activas las vías de señalización intracelular. Cuando se utiliza el GTP γ S, la subunidad G α queda unida a éste en forma permanente. Como consecuencia de esto tenemos que las subunidades G $\beta\gamma$, por su parte, conservan su estado de unión con el canal

iónico. El que esta segunda unión sea igualmente permanente es consecuencia de la primera. Mientras la subunidad G α se mantenga unida al GTP, las otras subunidades que corresponden al dímero G $\beta\gamma$, permanecerán sin elementos que puedan separarlas del canal iónico.

Por otra parte, se han obtenido resultados que confirman la presencia de las proteínas G con experimentos en los que, una vez establecido el sello arriba descrito, se retira la micro-pipeta de la célula. Queda aislada una micro-área de membrana, el mencionado parche, la cual permanece unida al círculo que hace el borde pulido de la punta de la micro-pipeta, con su lado interno expuesto a la solución de perfusión. En esta configuración es posible abrir los canales K(Ach) sin aplicar el agonista muscarínico o el GTP, sino solamente aplicando a la cara interna de la membrana una solución que contenga las subunidades G $\beta\gamma$.

La aseveración de que se requiere una proteína G para la activación del canal K(Ach) quedó confirmada cuando en líneas celulares en las que se expresan canales K(Ach) clonados, es posible mantener a estos canales constitutivamente abiertos si, en estas células, se expresan conjuntamente (coexpresión) las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G. La activación de los canales K(Ach) fue el primer hallazgo de señalización delimitada a la membrana mediada por las subunidades G $\beta\gamma$. Actualmente se han descrito otros procesos en los cuales participan las señales delimitadas a la membrana (24-28).

CONCLUSIÓN

Las células reaccionan a una gran cantidad de estímulos extracelulares a través de proteínas receptoras específicas que se localizan tanto en la membrana plasmática como en el interior de la célula. Entre estos estímulos se encuentran las hormonas, los neurotransmisores, los factores de crecimiento, la luz, los olores, los sabores, etc. La interacción de estos estímulos o ligandos con sus receptores genera la activación ordenada de proteínas efectoras y/o la modulación de genes específicos que, finalmente, inducen una determinada respuesta celular, conocida como vía de transducción de señales. Existen múltiples vías de transducción de señales, que involucran procesos bioquímicos de recepción y transferencia de mensajes, desde exterior hasta el interior de la célula, algunas de las cuales pueden ser mediados por los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Los GPCRs son proteínas transmembranales que comparten el dominio intracitoplásmico de unión a una proteína G, pero en contraste, muestran una gran heterogeneidad en la porción extracelular que realiza la unión de ligando. Las proteínas G heterotriméricas ($\alpha\beta\gamma$), al ser activadas por el GPCR se

disocian en el dímero $G\beta\gamma$ y la subunidad $G\alpha$, las cuales, dependiendo de las isoformas de las subunidades $\alpha\beta\gamma$, pueden actuar independientemente sobre una gran variedad de efectores tales como la adenilil ciclase, las fosfodiesterasas, la fosfolipasa C o los canales iónicos, entre otros. El efecto del dímero $G\beta\gamma$ puede ser independiente, antagonista o sinérgico al efecto de $G\alpha$.

Con relación a la modulación de la actividad marcapaso de las células cardíacas por la activación de los receptores muscarínicos, se ha demostrado que la acetilcolina se une al receptor muscarínico M₂. Esta unión ligando-receptor activa una proteína G de la cual se disocia el dímero $G\beta\gamma$. Este dímero se mantiene anclado a la cara interna de la membrana plasmática, ejerciendo una acción rápida, directa, delimitada a la membrana y que no requiere fosforilación sobre los canales de K⁺. Estos canales K(Ach), hacen más lenta la despolarización de la célula marcapaso e inducen la disminución de la frecuencia cardiaca. Tales mecanismos delimitados a la membrana, no sólo pueden abrir en forma rápida a los canales de K⁺ tipo K(Ach), sino que también pueden ejercer acciones sobre otros procesos fisiológicos.



REFERENCIAS

1. Xiao X, Wang P, Chou KC (2009) GPCR-CA: A Cellular Automaton Image Approach for Predicting G-Protein-Coupled Receptor Functional Classes. *J Comput Chem* 30:1414-1423.
2. Wess J, Han SJ, Kim SK, Jacobson KA, Li JH (2008) Conformational changes involved in G-protein-coupled-receptor activation. *Trends Pharmacol Sci* 29:616-625.
3. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.
4. Strader CD, Fong TM, Graziano MP, Tota MR (1995) The family of G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 9:745-754.
5. Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick JA, Conn PM (1999) Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Arch Med Res* 30:420-435.
6. Eglen RM, Bosse R, ReisineT (2007) Emerging Concepts of Guanine Nucleotide-Binding Protein-Coupled Receptor (GPCR) Function and Implications for High Throughput Screening. *Assay Drug Dev Technol* 5:425-451.
7. Rangel-Serrano A (1999) Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. *BEB* 18:53-59.
8. Suzuki N, Hajicek N, Kozasa T (2009) Regulation and Physiological Functions of G12/13-Mediated Signaling Pathways. *Neurosignals* 17: 55-70.
9. Herroeder S, Reichardt P, Sassmann A, Zimermann B Jaeneke D, Hoecknerr J, Hollmann MW, Fischer KD, Vogt S, Grosse R, Hogg N, Gunzer M, Offermanns S, Wettschureck N. (2009) Guanine nucleotide-binding proteins of the G12 family shape immune functions by controlling CD4+ T cell adhesiveness and motility. *Immunity* 30:708-20.

10. Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:423-450.
11. Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG, Spiegel AM (1991) G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain. *J Biol Chem* 266:5363-5366.
12. Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
13. Díaz-Cardenas AF, Arenas I, García DE (2008) PMA counteracts G protein actions on Ca(V)2.2 channels in rat sympathetic neurons. *Arch Biochem Biophys* 473:1-7.
14. Giles W, Noble SJ (1976) Changes in membrane currents in bullfrog atrium produced by acetylcholine. *J Physiol* 261:103-123.
15. Hescheler J, Kameyama M, Trautwein W (1986) On the mechanism of muscarinic inhibition of the cardiac Ca current. *Pflügers Arch* 407:182-189.
16. Siegel GJ, Albers RW, Brady S, Price DL (2006) Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. Elsevier, 7a. Edition, Philadelphia EUA.
17. Hartzell HC (1988) Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine, and second Messenger systems. *Prog Biophys Molec Biol* 52:165-247.
18. Yatani A, Brown AM (1989) Rapid beta-Adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science* 245:71-74.
19. Trautwein W, Dudel J (1958) Zum Mechanismus der Membranwirkung des Acetylcholin an der Herzmuskelfaser. *Pflügers Arch* 266:324-334.
20. Sakmann B, Noma A, Trautwein W (1983) Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in isolated pacemaker cells of the mammalian heart. *Nature* 303:250-253.
21. Zhou XB, Lutz S, Utku E, Sausbier U, Ruth P, Wieland T, Korth M (2008) M₂ muscarinic receptors induce airway smooth muscle activation via a dual G $\beta\gamma$ -mediated inhibition of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel activity. *J Biol Chem* 238:21036-21044.
22. Breitwieser GE, Szabo G (1985) Uncoupling of cardiac muscarinic and beta-adrenergic receptors from ion channels by guanine nucleotide analogue. *Nature* 317:538-540.
23. Breitwieser GE, Szabo G (1988) Mechanism of muscarinic receptor-induced K⁺ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 91:469-493.
24. Soejima M, Noma A (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Arch* 400:424-431.
25. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325:321-326.
26. Reuveny E, Slesinger PA, Inglese J, Morales JM, Iniguez-Lluhi JA, Lefkowitz RJ, Bourne HR, Jan YN, Jan LY (1994) Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein beta gamma subunits. *Nature* 370:143-146.
27. Morrey C, Estephan R, Abbott GW, Levi R (2008) Cardioprotective Effect of Histamine H3-Receptor Activation: Pivotal Role of G-Dependent Inhibition of Voltage-Operated Ca²⁺ Channels. *JPET* 326:871-878.
28. Hu C, Depuy SD, Yao J, McIntire WE, Barrett PQ (2009) Protein kinase A activity controls the regulation of T-type CaV3.2 channels by Gbetagamma dimmers. *J Biol Chem* 284:7465-7473.
29. Tedford HW, Zamponi GW (2006) Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev* 58:837-862.