

415
2ej.



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

**“REGULACION HORMONAL DE LA
ACUMULACION DE AMP. Y EFECTO
DE LA TOXINA PERTUSSIS”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

SIMONE SYLVIE CHRIST DE NEYMET

México, D. F.

Junio de 1987



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Introducción.....	1
Objetivos.....	21
Materiales y Métodos.....	22
Resultados.....	25
Discusión.....	29
Conclusiones.....	37
Bibliografía.....	38

I N T R O D U C C I O N

Las células necesitan establecer cierta comunicación con el medio que las rodea con el fin de llevar a cabo satisfactoriamente sus funciones metabólicas y poder adaptarse rápidamente a las variaciones de su entorno. En los organismos multicelulares la separación de las funciones y la especialización de poblaciones celulares en órganos y tejidos hacen esta comunicación aún más compleja pues implica la coordinación precisa de todos estos grupos celulares.

En los organismos llamados "superiores" existen dos vías principales de comunicación intercelular: el sistema endócrino y el sistema nervioso; estos sistemas difieren entre sí por su modo de acción (las señales neuronales producen su efecto de una manera más rápida y directa que las hormonas). Sin embargo, ambos sistemas presentan similitudes a nivel de origen embriológico, a nivel celular e incluso a nivel molecular pues ambos producen la liberación de un mensajero capaz de interactuar con receptores específicos de la célula blanco. Estos mensajeros tienen una estructura molecular muy variada pero pueden dividirse en tres grandes clases: los que tienen una naturaleza lipídica, como los esteroides derivados del colesterol, los que presentan una naturaleza polipeptídica, como la insulina, el glucagón y la angiotensina (entre otros) y finalmente los de tipo amina entre los cuales se encuentran las hormonas tiroideas y la adrenalina o epinefrina (1).

Los mensajeros hormonales van a interactuar con sus respectivos receptores que pueden estar localizados en la membrana plasmática o bien en el interior de la célula. Existe cierta relación entre la localización del receptor y la naturaleza química del agonista: así,

por ejemplo, las hormonas tiroideas y las esteroides, por ser de tamaño relativamente pequeño y presentar características parcialmente hidrofóbicas atraviesan la membrana plasmática, probablemente por difusión, y tienen receptores internos.

Sin embargo muchas de las señales hormonales que llegan a las células no traspasan la membrana plasmática sino que son detectadas por sus receptores membranales y estos, a su vez, desencadenan todo un proceso que conduce a la generación de mensajes secundarios, siendo estos últimos los que regulan los procesos metabólicos. Es decir, existen mecanismos que reciben la información extracelular y la transforman en una nueva señal, interna, conocida como segundo mensajero, que puede ser una molécula o un ión, que tiene la capacidad de regular funciones fisiológicas y bioquímicas. Este proceso se denomina transducción.

Hasta la fecha se conocen dos vías principales de señal acopladas a los receptores externos: una de ellas consta de la enzima adenilato ciclasa, regulada por proteínas que pueden unir nucleótidos de guanina (proteínas de tipo N) y responsable de la formación del monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c). La otra involucra el recambio de fosfoinosítidos liberando así dos moléculas mensajeras: el diacilglicerol (DG) y el inositol-trifosfato (IP₃), produciendo este último la liberación de calcio intracelular (2). Analizaré con más detalle estos dos sistemas de transducción.

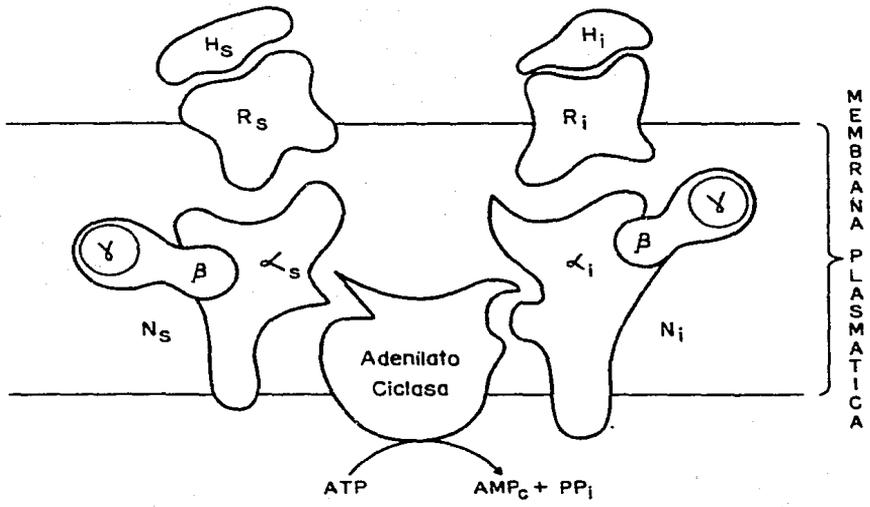
El sistema de la adenilato ciclasa

Muchas hormonas actúan en las células eucariontes modificando los

niveles internos del monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c) a través de la modulación de la actividad de la enzima responsable de su formación, la adenilato ciclasa. Este segundo mensajero activa una serie de proteínas cinasas (quinasas del tipo A) al liberar a la subunidad catalítica de la subunidad reguladora, y éstas a su vez fosforilan distintas proteínas cruciales para los procesos metabólicos.

En 1971 el grupo de Rodbell logró demostrar que no solo se necesitaba el receptor, el agonista y la enzima para observar la formación de AMP_c sino que también se requería de la presencia de nucleótidos de guanina, sugiriendo así la existencia de una proteína acopladora entre el receptor y la enzima, conocida como proteína N (o G). Ahora se sabe que la adenilato ciclasa está modulada por dos vías, una estimuladora y otra inhibidora que constan, cada una de ellas, de sus receptores propios (R_s , R_i) y de sus proteínas N respectivas (N_s , N_i) (Cf. esquema 1).

a) Receptores: Ambos tipos de receptores se encuentran frecuentemente glucosilados y embebidos en la membrana plasmática, presentando hacia el exterior el sitio de unión del agonista. Los receptores R_s promueven el incremento de los niveles de AMP_c al estimular a la adenilato ciclasa. Como ejemplos de estos receptores se pueden mencionar a los β -adrenérgicos, a los del glucagon, a los de la vasopresina, así como a los de otras hormonas; los receptores β -adrenérgicos son glucoproteínas formadas por una sola cadena polipeptídica y se dividen, farmacológicamente en dos subclases, la β_1 (peso molecular: 40-50 kDa) y la β_2 (58-67 kDa) aun cuando estudios recientes han demostrado que presentan grandes similitudes en sus características estructurales.



Esquema I.: El sistema de la adenilato ciclasa.

H = agonistas; R = receptores.

inmunológicas y bioquímicas (3).

Los receptores R_1 provocan la disminución de los niveles de AMP_c al inhibir a la enzima; entre estos se encuentran los receptores del tipo α_2 -adrenérgicos, los de la acetilcolina, los de la angiotensina II y los de los péptidos opioides.

b) Proteínas N y mecanismo de acción: Las proteínas N son las responsables del acoplamiento entre el receptor y la adenilato ciclasa; presentan varias propiedades en común: son capaces de unir iones magnesio y nucleótidos de guanina, son sustrato de la actividad de ADP-ribosiltransferasa que presentan ciertas toxinas bacterianas y tienen función de GTP-asas. Por otra parte las proteínas N están formadas por tres subunidades, la alfa, la beta y la gama; las subunidades alfa difieren entre las proteínas N pues presentan un peso molecular de 42 a 52 kDa en el caso de N_2 y un peso de 39 a 41 kDa en el caso de N_1 . Muchas células contienen dos formas de la subunidad alfa de la proteína N_2 , de distinto peso molecular: se ha propuesto que los RNA mensajeros que codifican para estas subunidades provienen de un mismo gene que ha sufrido un procesamiento distinto en cada uno de los casos (4). Las subunidades beta, así como las gama son muy parecidas en las dos proteínas, con pesos moleculares respectivos de 35 kDa y de 5 a 8 kDa.

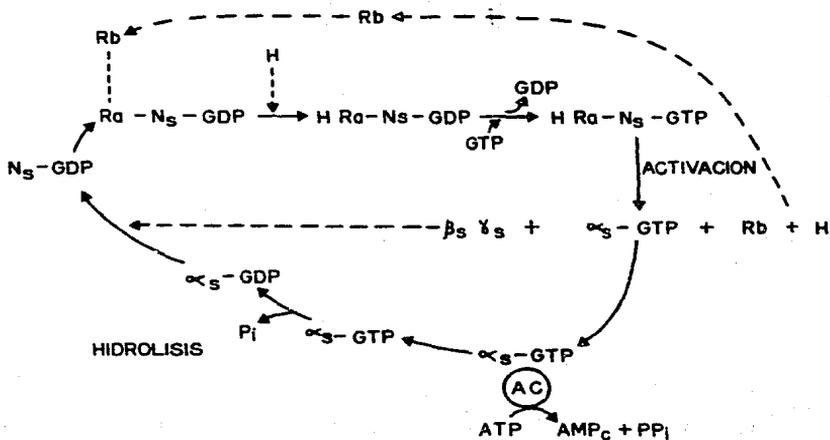
Las subunidades α presentan un sitio de unión de nucleótidos de guanina, tienen muy probablemente la función de GTP-asas, y en el caso de N_2 , son las responsables de la activación de la adenilato ciclasa; en el caso de N_1 se piensa que α interacciona inhibitoriamente con la enzima, aunque su función, hasta ahora, no ha sido bien determinada (5). Por otra parte, poco se sabe de la interacción entre el receptor y

las proteínas N: se ha propuesto que de alguna manera las otras dos subunidades presentan un sitio de reconocimiento y unión al receptor (6).

Las proteínas N en su estado basal, inactivo, se encuentran integradas por las tres subunidades unidas entre sí y pueden seguir el siguiente ciclo: unión de una molécula de GTP, activación de la proteína, hidrólisis del GTP, desactivación de la proteína y liberación del GDP. El estado de activación de la proteína implica la disociación de la subunidad α -GTP y del complejo $\beta\gamma$. Al agregar un agonista a todo el sistema se forma un complejo hormona-receptor que provoca un incremento en la activación de la proteína N indicada (dependiendo del agonista) al incrementar la hidrólisis del GTP y el intercambio de nucleótidos de guanina.

Al ser estimulada la vía de activación de la adenilato ciclasa (por R_s y N_s) se produce la liberación de la subunidad α_s , unida a una molécula de GTP, y el complejo $\beta_s\gamma_s$; la subunidad α_s -GTP va a interaccionar con la parte catalítica de la enzima y se produce la formación de AMP_c . La hidrólisis del GTP desactiva la subunidad α_s que es capaz de volver a unirse con el complejo $\beta_s\gamma_s$ para formar de nuevo la proteína N_s -GDP inactiva (Cf. esquema II).

Para explicar este proceso se han propuesto modelos que involucran la participación de receptores en dos estados de afinidad para los agonistas: alta afinidad (R_a) y baja afinidad (R_b), interconvertibles entre sí. El receptor aislado se encuentra en baja afinidad (R_b) pero al asociarse con el complejo N_s -GDP pasa a alta afinidad: R_a - N_s -GDP. La acción del agonista (H) estimula el recambio GDP-GTP que produce la liberación del receptor que pasa al estado de baja afinidad y la



Esquema II: Posible mecanismo de acción para explicar la vía estimuladora de la adenilato ciclasa. R_a - receptor en estado de alta afinidad; R_b = receptor en estado de baja afinidad; H = agonista; AC = adenilato ciclasa.

activación de N_s que se disocia en α_s -GTP y $\beta_s\gamma_s$; la subunidad α_s -GTP activa a la adenilato ciclasa y es desactivada al producirse la hidrólisis del GTP. Posteriormente las subunidades se reasocian entre sí para formar N_s -GDP (7). Otros autores, entre ellos Lefkowitz, proponen que el complejo hormona-receptor permanece unido a la subunidad α_s -GTP y su liberación se produce cuando se hidroliza el GTP; el intercambio de nucleótidos se lleva a cabo al unirse el receptor a la proteína N_s , y este último permanece en estado de baja afinidad hasta que es ocupado por su agonista (8).

Ahora bien, al ser estimulada la vía inhibitoria a través de N_i (proceso que requiere de la presencia de cationes monovalentes como Na^+) se produce también la liberación de α_i -GTP y del complejo $\beta\gamma$. Se piensa que un incremento en los niveles del complejo $\beta\gamma$ (muy similar en las dos proteínas N) inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa por N_s al evitar su disociación y la liberación de α_s -GTP; se lleva a cabo la reversión de la activación de N_s por acción de masas. Este fenómeno se presenta puesto que N_i , por tener una mayor afinidad por el GTP que N_s se disocia más rápidamente; por otra parte la subunidad α_s presenta una mayor tendencia a reasociarse que α_i (9).

Por otro lado se ha postulado que la proteína N_i -GTP activada es capaz de inhibir directamente a la enzima, probablemente por medio de la subunidad α_i -GTP (6,9); se ha logrado demostrar que la subunidad α_i -GTP no desplaza competitivamente a la subunidad α_s -GTP por un sitio común en la adenilato ciclasa (8). De esta manera, la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa puede ser, muy probablemente, el resultado combinado de la inhibición directa por la proteína N_i y de la desactivación de la proteína N_s consecuente a la liberación del

complejo $\beta\gamma$ de N_1 .

c) Toxina pertussis: Se mencionó anteriormente que las proteínas N eran sustrato de la actividad de ADP-ribosiltransferasa que presentan ciertas toxinas bacterianas: la subunidad α de N_1 es modificada por una toxina producida por el bacilo del cólera, de tal manera que se bloquea la hidrólisis del GTP y por lo tanto se mantiene el estado activado (α_s -GTP). La proteína N_1 , así como otra proteína que une nucleótidos de guanina (inicialmente detectada en el cerebro de bovinos pero presente en muchos tejidos y con un peso molecular de 39 kDa, llamada N_0), son ADP-ribosiladas por una de las toxinas producidas por la *Bordetella pertussis*, la toxina pertussis; esta última bloquea, en múltiples tipos celulares la acción de hormonas que estimulan la vía inhibitoria de la adenilato ciclasa (7,12,16).

La toxina pertussis es un hexámero de peso molecular igual a 117 kDa, compuesto por 5 subunidades distintas: S_1 (28 kDa), S_2 (23 kDa), S_3 (22 kDa), S_4 (11.7 kDa) y S_5 (9.3 kDa), con una estequiometría de 1:1:1:2:1. Bajo ciertas condiciones la toxina se disocia en S_1 y un pentámero formado por las subunidades restantes: S_1 es enzimáticamente activa por lo que se conoce como el protómero A y el pentámero desempeña un papel de fijación a la membrana plasmática (oligómero B) (10,11).

El proceso de fijación de la toxina a un receptor de la membrana, probablemente una glucoproteína, es relativamente rápido; sin embargo la penetración de la toxina a través de la membrana es un proceso lento y corresponde al período de latencia, que puede durar de 2 a 4 horas en células en cultivo. Ahora bien, para que se lleve a cabo la acción de la toxina se ha sugerido que se requiere de enzimas capaces de liberar

al protómero A y de romper, por reducción, los puentes disulfuro que contiene. De hecho se ha propuesto que el protómero A es hidrolizado a un péptido de peso molecular de 24 kDa que presenta la actividad de ADP-ribosiltransferasa después de la reducción de sus grupos disulfuro internos: este péptido sería la forma activa del protómero A y por lo tanto se requiere de una proteasa para formarlo (12).

El sustrato del protómero activo corresponde a la subunidad α de N_1 (41 kDa) que es ADP-ribosilada a partir del nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), liberándose la molécula de nicotinamida (13). El amino ácido al que se une la ADP-ribosa no ha sido identificado aún, pero se sabe que en otra proteína similar, la transducina, se trata de un residuo de asparagina. Cabe mencionar que en las membranas de adipocitos de rata la toxina cataliza la ADP-ribosilación de la subunidad α de N_1 y de un péptido distinto (39 a 40 kDa) pero de gran homología estructural y de función desconocida (14,15): probablemente se trata de N_2 .

La toxina, al ADP-ribosilar a N_1 , bloquea dos procesos estimulados por la interacción del complejo hormona-receptor con la proteína, i.e. la actividad de GTPasa y la liberación del GDP. De esta manera el GTP permanece unido a N_1 y por lo tanto disminuye la formación del estado de alta afinidad de los receptores: esto ocasionaría que la proteína se encontrará entonces en un estado activado "permanente" ejerciendo constantemente su efecto inhibitorio sobre la adenilato ciclasa. Sin embargo no se ha observado este efecto por lo que se ha sugerido que la ADP-ribosilación de N_1 modifica de tal manera la proteína que le impide interactuar efectivamente con la subunidad catalítica de la enzima (7,16) o con el receptor (17,18,19).

Finalmente cabe mencionar que en muchos tipos celulares la toxina pertussis amplifica la respuesta a hormonas que estimulan a la adenilato ciclasa, esto es, se observa una mayor producción de AMP cíclico con respecto a los controles; esto sugiere que la actividad basal del mecanismo inhibitorio restringe a la enzima en condiciones normales, y que dicha restricción se elimina por la acción de la toxina (20).

El sistema de fosfoinosítidos-calcio

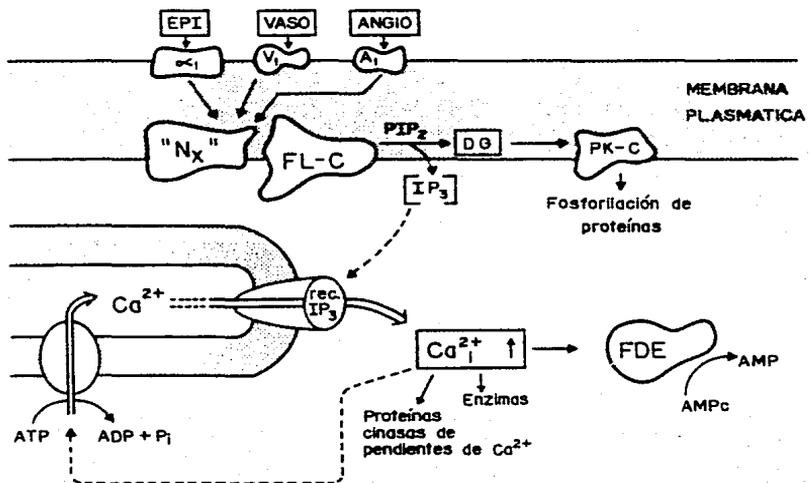
En 1953 Hokin y Hokin descubrieron que al estimular diversos tejidos, tanto nerviosos como secretores, con hormonas como la acetilcolina se producía un aumento en el recambio del fosfatidilinositol, un fosfolípido constituyente de la membrana plasmática. Entre 1969 y 1979 Michell y otros investigadores sugirieron que los fosfoinosítidos juegan un papel importante en un nuevo mecanismo de señal acoplado a receptores; en base a una fuerte correlación existente entre el recambio de fosfoinosítidos estimulado por señales externas y la movilización de calcio intracelular propusieron la existencia de un nuevo mecanismo de transducción que involucraba, como paso inicial, un recambio de fosfoinosítidos y éste a su vez provocaba modificaciones en la concentración intracelular de calcio libre. Fain y Berridge en 1979 lograron demostrar experimentalmente que se requería de fosfatidilinositol para la movilización de calcio controlada por receptores (21).

Ahora se sabe que la ocupación de ciertos receptores por sus agonistas desencadena la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP_2), un lípido poco usual formado a partir del

fosfatidilinositol (PI). Este último se ha encontrado en todas las células eucariotes estudiadas hasta la fecha y constituye una pequeña proporción de los fosfolípidos de la membrana: es transformado a fosfatidilinositol 4 fosfato (PIP) y a fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (PIP₂) por dos cinasas unidas a la membrana plasmática. De hecho, en células no estimuladas, estos tres fosfolípidos se interconvierten entre sí por medio de un recambio relativamente rápido.

La hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato, consecuente a una estimulación por señales externas, genera dos productos que desempeñan funciones de segundos mensajeros y tienen, en consecuencia, su propio blanco intracelular: el diacilglicerol (1-2 DG) que activa una proteína cinasa dependiente de calcio y de fosfolípidos (proteína cinasa C) y el inositol-trifosfato (IP₃) que estimula la liberación de calcio de una poza interna (Cf. esquema III). Este sistema de señal cuenta con dos segundos mensajeros y un tercero (el calcio liberado) por lo que confiere a sus agonistas una gran diversidad en el control del metabolismo celular.

a) Receptores y proteínas N: Un gran número de agentes estimulan la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato por medio de sus receptores específicos; entre estos se encuentran los agentes α_1 -adrenérgicos, la histamina (H₁), la angiotensina II, etc. Experimentos realizados por diferentes grupos demostraron que la hidrólisis se lleva a cabo en presencia de GTP: se propuso entonces la existencia de una proteína "N", denominada N_x, que acoplaría el receptor a la enzima responsable de la hidrólisis (la fosfolipasa C). En algunos sistemas como los hepatocitos y los miocitos cardíacos, entre otros, la proteína N_x hipotética no es sensible a la toxina



Esquema III: El sistema de fosfoinosítidos-calcio.

pertussis. sugiriendo que no se trata de N_1 o N_0 (22,23,24). Sin embargo, existen evidencias de que, en otros grupos celulares como las células cultivadas de músculo liso vascular, las células leucémicas diferenciadas a neutrófilos y los adipocitos de rata, esta proteína parece ser ADP-ribosilada por la toxina (15,25,26). De hecho N_1 no ha sido purificada hasta ahora, y bien pudiera ser que no se tratara de una sola proteína sino de toda una familia de proteínas capaces de unir nucleótidos de guanina.

La enzima responsable de la hidrólisis del PIP_2 se conoce como fosfodiesterasa, fosfoinositidasa C o fosfolipasa C y requiere de calcio para su actividad. Una gran variedad de células contienen múltiples formas moleculares de esta enzima, con características similares, que pueden encontrarse en el citoplasma o bien asociadas a la membrana plasmática; parece ser que la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato se lleva a cabo por una fosfolipasa C unida a la membrana y controlada por receptores, probablemente a través de N_1 (27). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los nucleótidos de guanina son capaces de estimular a una fosfolipasa C soluble, específica para fosfoinosítidos, provocando así la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato (28).

b) Diacilglicerol: Uno de los productos de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato es el 1-2 diacilglicerol, una molécula que desempeña dos funciones principales: presenta la propiedad de estimular a la proteína cinasa C y representa también una fuente importante para la formación de ácido araquidónico.

La proteína cinasa C fue identificada en 1977 en el laboratorio de Nishizuka: consta de una sola cadena polipeptídica de 77 kDa con dos

dominios funcionales. Para su actividad requiere de calcio, de fosfatidilserina y de diacilglicerol ya que, con este último, la enzima puede activarse a concentraciones fisiológicas de calcio: así el diacilglicerol aumentaría su afinidad por el catión. Por otra parte se ha propuesto que la presencia del diacilglicerol es capaz de provocar la unión de la proteína cinasa C soluble a la cara interna de la membrana, proceso anterior a la activación de la enzima.

En 1982 el grupo de Nishizuka reportó que los ésteres de forbol (que son una serie de compuestos diterpénicos que promueven la formación de tumores) como el forbol 12-miristato 13-acetato o PMA, tenían la propiedad de activar a la proteína cinasa C, probablemente por presentar en sus grupos acilo una analogía estructural con el diacilglicerol; se piensa ahora que estos compuestos actúan al interaccionar con receptores específicos localizados en la membrana plasmática, probablemente la misma proteína cinasa C, y aumentan la sensibilidad de la enzima por el calcio.

Por otra parte el diacilglicerol se encuentra constituido en parte por dos ácidos grasos, uno saturado (el ácido esteárico) y otro insaturado, de gran importancia por ser el precursor de numerosos metabolitos importantes, el ácido araquidónico. Se han postulado dos vías principales para la obtención de este último a partir de los fosfoinosítidos: una de ellas estipula que el ácido fosfatídico, obtenido a partir de la fosforilación del diacilglicerol, es el sustrato de la fosfolipasa A₂, una enzima dependiente de calcio, liberándose así como producto el ácido araquidónico (29,30). La otra hipótesis propone que este último se obtiene por la desacilación del diacilglicerol, proceso catalizado por una diacilglicerol lipasa

(31,32,33); parece ser que en numerosos tejidos predomina esta segunda vía (34).

c) Inositol trifosfato: El segundo producto de la hidrólisis del fosfatidilinositol 4-5 bifosfato es el inositol 1-4-5 trifosfato que es capaz de liberar iones calcio de ciertos depósitos internos; el hecho de que estas pozas se llenen de nuevo con calcio del medio extracelular ha sugerido que se encuentran localizadas cerca de la membrana plasmática. No se conoce aún con certeza la naturaleza de estos depósitos: las mitocondrias han sido descartadas y probablemente las pozas sean derivados especializados del retículo endoplásmico (27).

Por otra parte se ha demostrado experimentalmente que el inositol trifosfato reconoce y se une a receptores específicos localizados en la membrana del depósito; se ha sugerido que al unirse este segundo mensajero a su molécula receptora se produce la apertura de un canal que permite la salida de iones calcio al mismo tiempo que se efectúa un movimiento compensador de otros iones monovalentes (35). Otros autores, entre ellos Gill (36,37), proponen la existencia de dos mecanismos involucrados en la liberación de calcio: uno de ellos requiere de la presencia e hidrólisis de nucleótidos de guanina (GTP) y el otro se encuentra modulado por el inositol trifosfato; esta hipótesis no descarta la posibilidad de una interacción estrecha entre estos dos procesos, o bien la existencia de una vía común activada por los dos efectores.

d) Calcio: El calcio liberado desempeña en realidad el papel de tercer mensajero o factor de acoplamiento en este sistema pues interacciona con ciertas proteínas estructurales y enzimáticas, incluyendo varias

proteína cinasas. En el hígado, por ejemplo, las catecolaminas, la angiotensina II y la vasopresina controlan la actividad de las enzimas regulatorias del metabolismo de los carbohidratos al modificar su estado de fosforilación, gracias a la elevación de las concentraciones de calcio intracelular; una de estas enzimas, la glucógeno fosforilasa, promueve la degradación del glucógeno al ser fosforilada por la fosforilasa b cinasa, y ésta, a su vez, es activada por la elevación de los niveles de calcio interno (38,39).

Es interesante hacer notar que se ha encontrado recientemente, al utilizar aequorina en hepatocitos aislados de rata, que la liberación de calcio provocada por estos agonistas se lleva a cabo por "picos" o cuantos de cierta duración (del orden de segundos) que se repiten a determinados intervalos de tiempo, dependiendo de la concentración de la hormona; entre cada "cuanto", el calcio libre regresa a su concentración basal (40). Por otra parte se ha notado que la entrada de calcio extracelular a la célula (influjo) es indispensable para que se mantenga la activación de las proteínas y enzimas provocada por la acción del calcio liberado (41).

Cabe mencionar, para los fines de este tesis, que entre las distintas enzimas activadas por el calcio se encuentra una fosfodiesterasa, sensible a la calmodulina, que degrada a los nucleótidos cíclicos, entre ellos, el AMP_c. Esta enzima en su estado nativo se presenta como una proteína globular dimérica, con un peso molecular de 120 kDa; requiere de una molécula de calmodulina por subunidad para activarse, y en ausencia de calcio esta última no se une a la enzima y no puede activarla. Se ha propuesto que, de esta manera, la ocupación de receptores por sus respectivos agonistas, en este

mecanismo de transducción, provoca la disminución de los niveles intracelulares de AMP cíclico (42).

A continuación se describirán brevemente las hormonas que se estudiarán en el presente trabajo, indicando su naturaleza química y los efectos que provocan en el organismo, especialmente en el tejido hepático.

Las hormonas de estudio

a) El glucagon: Fué descubierto en 1923 por Merlin y sus colaboradores y purificado treinta años después; se trata de una hormona polipeptídica, de cadena única constituida por 29 amino ácidos y de un peso molecular aproximado de 3.5 kDa (Cf. esquema IV). Es secretado por las células alfa de los islotes de Langerhans del páncreas y desempeña un papel de agente hiperglicemiante, es decir, aumenta los niveles de glucosa en la sangre: en el hígado acelera la glucogenólisis y la gluconeogénesis, mientras que en el tejido adiposo incrementa la lipólisis (43).

Hasta el momento se conoce solamente un tipo de receptor para el glucagon, y éste se encuentra acoplado activatoriamente a la adenilato ciclasa, a través de N_s . En consecuencia los efectos metabólicos de esta hormona se atribuyen principalmente a un aumento en los niveles intracelulares de AMP_c. Sin embargo ciertos trabajos, algunos de ellos realizados en nuestro laboratorio, parecen indicar que en el hígado el glucagon podría también actuar a través de la otra vía (recambio de fosfoinosítidos) (44,45). Houslay y sus colaboradores han propuesto que a bajas concentraciones el glucagon produce la ruptura de

polifosfoinosítidos y la liberación de inositol fosfatos, mientras que a concentraciones más elevadas activa a la adenilato ciclasa; por otra parte ambos sistemas de transducción presentarían la capacidad de regularse entre sí (46).

b) La vasopresina: Conocida también como hormona antidiurética, es un péptido pequeño de nueve amino-ácidos, cuya estructura, que se representa en el esquema IV, fué determinada por Du Vigneaud en 1954. Es producida por las células nerviosas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo y emigra a las terminaciones nerviosas o gránulos secretores, donde se acumula y de donde es liberada. Esta importante hormona desempeña varias funciones de gran importancia: aumenta la contracción de los vasos y la tensión arterial por una parte (vasopresina), y por otra disminuye la diuresis (antidiurética), es decir, la pérdida de líquidos por la orina; en el hígado actúa como agente glucogenolítico. Por otra parte es capaz de provocar la agregación de las plaquetas sanguíneas humanas (43).

En base a criterios funcionales y farmacológicos se pueden distinguir dos tipos de receptores para la vasopresina: los V_1 y los V_2 . Los receptores V_1 son responsables de los efectos presores y de la glucogenólisis hepática: ejercen su acción por medio de un incremento en la concentración de calcio intracelular, consecuente a la liberación de inositol trifosfato; estos efectos son estrictamente dependientes de calcio extracelular, y en ciertas líneas celulares se ha comprobado que la activación de la fosfolipasa C requiere de la presencia de nucleótidos de guanina (47,48). Los efectos antidiuréticos se ejercen mediante la activación de los receptores renales V_2 que se encuentran acoplados en forma activatoria a la adenilato ciclasa, a través de N_2 .

c) La epinefrina o adrenalina: En 1895 Oliver y Schafer demostraron por primera vez el efecto presor de los extractos suprarrenales; el principio activo fué llamado adrenalina por Abel en 1899 y fué sintetizado poco después por Stolz en 1904 y Dakin en 1905. Esta hormona se encuentra formada por un grupo catecol y una cadena alifática, la etil, metil, amina que tiene en la posición β un grupo hidroxilo: pertenece por lo tanto al grupo de las catecolaminas (Cf. esquema IV). Se forma a partir de la tirosina principalmente en la médula de la glándula suprarrenal y en algunas neuronas (neuronas simpáticas), y desempeña en el organismo un gran número de funciones: entre otras, es liberada en casos de estrés y peligro ya que es capaz de incrementar ciertos procesos fisiológicos con el fin de preparar al organismo a una respuesta rápida y adecuada (lucha, huida). Sus efectos pueden agruparse en cinco grandes tipos: produce una acción excitadora periférica en ciertos músculos lisos (los de los vasos sanguíneos de la piel), mientras que ejerce una acción inhibitoria en otros tipos de músculo liso como el intestino, el árbol bronquial, etc; produce una acción excitadora en el corazón y en el sistema nervioso central, y finalmente regula diversos procesos metabólicos: promueve un incremento en la glucogenólisis en el hígado y la liberación de ácidos grasos en el tejido adiposo (43).

Ahlquist en 1948 propuso la existencia de dos grandes grupos de receptores para las catecolaminas, que denominó α y β . Posteriormente, en base a criterios farmacológicos y funcionales estas dos clases se dividieron, a su vez, en dos subtipos (α_1 , α_2 , β_1 , β_2). Los receptores β , subdivididos en 1967 por Lands y colaboradores en base a su afinidad relativa por ciertos agonistas, se encuentran acoplados a la adenilato

ciclasa de manera estimuladora y ya se describieron anteriormente.

Los receptores α adrenérgicos se han dividido en α_1 y α_2 en base a su afinidad por agonistas y antagonistas, pero también en base a que están acoplados a distintos mecanismos de transducción. Los receptores α_2 se encuentran acoplados inhibitoriamente a la adenilato ciclasa mientras que los α_1 forman parte del sistema que involucra el recambio de los fosfolinosítidos y la liberación de calcio intracelular (49). El receptor α_2 purificado tiene un peso molecular de 64 kDa y el α_1 un peso de 80 kDa; en contraste con los receptores del tipo β , parece ser que existe poca homología estructural entre estos dos subtipos (50).

Finalmente cabe mencionar que en nuestro laboratorio se ha postulado la existencia de dos mecanismos de transducción para los receptores α -adrenérgicos en el tejido hepático de rata: uno de ellos, que comparte con la vasopresina y la angiotensina II, involucra el recambio de fosfolinosítidos y la liberación de inositol-trifosfato y diacilglicerol; este sistema es dependiente de la concentración de calcio extracelular, es insensible a la inhibición por insulina y es modulado por hormonas tiroideas. El otro mecanismo es modulado por glucocorticoides, es independiente de calcio extracelular y es sensible a la insulina (51 a 59).

d) La angiotensina II: En 1898, Tiegerstedt y Bergman observaron que los extractos de riñón contenían un principio presor que denominaron renina; después se precisó que la renina no era en sí misma una substancia presora sino la enzima que iniciaba la formación del compuesto farmacológicamente activo, un péptido, a partir de una proteína del plasma (Braun-Menéndez et al, 1940; Page y Helmer, 1940). El péptido recibió el nombre de angiotensina, y el sustrato se

denominó angiotensinógeno. De 1954 a 1956 Skeggs, Elliott y Peart descubrieron la composición y estructura de la angiotensina y ésta fue sintetizada poco después por Schwyzer. *In vivo* la renina produce la liberación de un decapeptido, la angiotensina I, a partir del angiotensinógeno; esta substancia tiene actividad limitada y es transformada, gracias a una dipeptidasa, en angiotensina II, un octapeptido muy activo (Cf. esquema IV).

La angiotensina II, el agente presor más potente conocido, produce sus efectos por dos acciones, una directa en las fibras musculares de los vasos y otra indirecta mediada por el sistema nervioso simpático; junto con la renina constituye un sistema que estimula la secreción de aldosterona, manteniendo así la concentración de electrólitos y el volumen sanguíneo (volemia) (43).

En el hígado la angiotensina II estimula la glucogenólisis y la gluconeogénesis por medio de la liberación de calcio intracelular al activar la hidrólisis de polifosfoinosítidos. Sin embargo esta hormona también es capaz de inhibir a la adenilato ciclasa y hasta la fecha no se sabe si ambos efectos se encuentran modulados por una o dos poblaciones de receptores. De hecho los receptores han sido solubilizados y se ha estimado su peso molecular que varía de 60 a 68 kDa (60,61). Ciertos datos experimentales sugirieron que los receptores presentaban un solo tipo de sitios de unión para el agonista (62); sin embargo Campanile y sus colaboradores determinaron la existencia de dos sitios de unión para la hormona, de distinto grado de afinidad (63,64). Gunther (65) identificó de nuevo los dos tipos de sitios de unión para los receptores y propuso que los de alta afinidad se encontraban relacionados con el mecanismo de transducción de

fosfoinosítidos-calcio, mientras que los sitios de baja afinidad estaban asociados a la inhibición de la adenilato ciclasa. Propuso entonces, como otros autores (66), la existencia de dos tipos de receptores para la angiotensina II, no interconvertibles entre sí y acoplados cada uno de ellos a un sistema de transducción diferente; una revisión más detallada puede encontrarse en 67.

O B J E T I V O S

Determinar el efecto de la epinefrina, la vasopresina y la angiotensina II sobre la acumulación de AMP cíclico producida por el glucagon en los hepatocitos de rata.

Determinar los mecanismos de acción de la angiotensina II en este tipo de tejido.

Analizar los efectos de la epinefrina sobre los niveles de AMP cíclico en presencia y en ausencia de calcio, y determinar que tipo de receptores se encuentran involucrados en el proceso.

Estudiar el efecto de la toxina pertussis sobre las modificaciones de los niveles intracelulares de AMP cíclico consecuentes a la acción de las hormonas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

a) Substancias y reactivos: La epinefrina, la vasopresina, el propranolol, la angiotensina II, la 3-isobutil-metil-xantina (MIX), la yohimbina, el ácido etilenglicol-bis-(β -amino-etil-eter)N,N'-tetraacético (EGTA) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. El glucagon fué donado por Eli Lilly, y se utilizaron colagenasas de Worthington y Cooper Biomedical. La prazosina se obtuvo de Pfizer, el A23187 de Calbiochem y el [3 H]AMP cíclico de New England Nuclear.

b) Animales: Se utilizaron ratas hembras Wistar de 200 a 250 g de peso alimentadas *ad libitum* con nutricubos Purina. En el caso de animales tratados con toxina pertussis se inoculó la dosis indicada (15 ó 50 μ g) intraperitonealmente tres días antes de la utilización de las ratas; cabe aclarar que ningún animal sucumbió por efecto de la toxina.

c) Aislamiento de los hepatocitos: Los hepatocitos se aislaron por el método de Berry y Friend (68) modificado por Tolbert et al (69). El aislamiento, lavado e incubación de las células se realizaron en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato (120 mM NaCl, 5mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 18mM NaHCO_3) con 10 mM de glucosa, saturado con O_2/CO_2 (95%:5%), pH 7.4 a 37° C. Los animales se anestesiaron con cloroformo hasta que alcanzaron el estado de paro respiratorio; se realizó una laparotomía media, se canuló la vena porta y se llevó a cabo una perfusión con el amortiguador antes citado adicionado de calcio (1.2 mM CaCl_2) y de colagenasa (7 a 13 mg), por un lapso de 10 a 20 minutos con el fin de obtener una digestión parcial del tejido. Posteriormente las células se dispersaron mecánicamente con la ayuda de

un tubito de plástico en una caja de Petri con el mismo amortiguador y se filtraron a los tubos de centrifuga a través de una tela de nylon. La suspensión celular se centrifugó a baja velocidad por un minuto y se repitió tres veces este proceso de lavado. En los casos en que se utilizó un medio sin calcio el lavado y los pasos posteriores se realizaron en amortiguador sin cloruro de calcio y adicionado de 0.5 mM EGTA (agente quelante). Después de la última centrifugación las células se resuspendieron en el amortiguador correspondiente, con y sin calcio (+EGTA) en un volumen final de 25 a 30 mg peso húmedo/ml y se preincubaron por 6 minutos en un baño de agitación a 37°C y a baja velocidad. La viabilidad se determinó con la ayuda de azul tripano al 0.1%.

d) Incubación en presencia de las hormonas: En el baño de agitación, a mayor velocidad y a la misma temperatura, las células se incubaron por dos minutos en presencia de los diferentes agentes; en el caso de utilizar amortiguador sin calcio y con 0.5 mM EGTA se agregó a cada tubo 100 μ M de 3-isobutil-1-metil-xantina (MIX), un inhibidor de la fosfodiesterasa.

e) Determinación del AMP cíclico: El AMP cíclico producido se determinó utilizando el método de Gilman (70), basado en la competencia por la unión del nucleótido frío y tritiado a una proteína cinasa dependiente de AMP_c; posteriormente el AMP cíclico libre se separó del nucleótido unido a la proteína con la ayuda de carbón activado y la radiactividad de cada muestra se determinó en un contador de centelleo líquido; el valor obtenido se comparó con una curva patrón, según se estipula en el método de Brown (71). Los resultados se expresan como

R E S U L T A D O S

Los hepatocitos aislados de ratas controles fueron incubados en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato con CaCl_2 1.2 mM en presencia de dosis crecientes de glucagon: la curva dosis-respuesta se presenta en la figura 1, y muestra un comportamiento característico con un valor basal de 0.91 ± 0.07 pmol AMP_c/mg peso húmedo y un efecto máximo de 3.63 ± 0.18 pmol AMP_c/mg peso húmedo obtenido a una concentración de 10^{-6} M. La angiotensina II (10^{-6} M) no ejerce un efecto significativo sobre la producción basal de AMP cíclico pero produce una reducción marcada a concentraciones más elevadas de glucagon, obteniéndose una disminución máxima (23.5 %) a una concentración de 10^{-8} M glucagon.

Con el fin de obtener información acerca del comportamiento de las demás hormonas se incubaron los hepatocitos con el mismo amortiguador, con una concentración fija de glucagon (10^{-6} M) y con dosis crecientes de angiotensina II, vasopresina, epinefrina + 10^{-8} M propranolol (un antagonista β -adrenérgico) y una concentración fija del ionóforo de calcio A23187; en la figura 2 se presentan estos resultados. A bajas concentraciones (10^{-8} M) los agentes producen una disminución significativa de los niveles de AMP cíclico producido por el glucagon, siendo la epinefrina la más potente (30.1%), seguida por la vasopresina (28.7%) y la angiotensina II (24.6%). A concentraciones más elevadas el efecto es aún mayor pues la epinefrina llega a una reducción del 36.4% y la angiotensina II a una disminución del 33.1%. Cabe mencionar que la angiotensina II muestra un comportamiento aparentemente bifásico. Por otra parte el ionóforo A23187, a una concentración de 10^{-8} M, produce

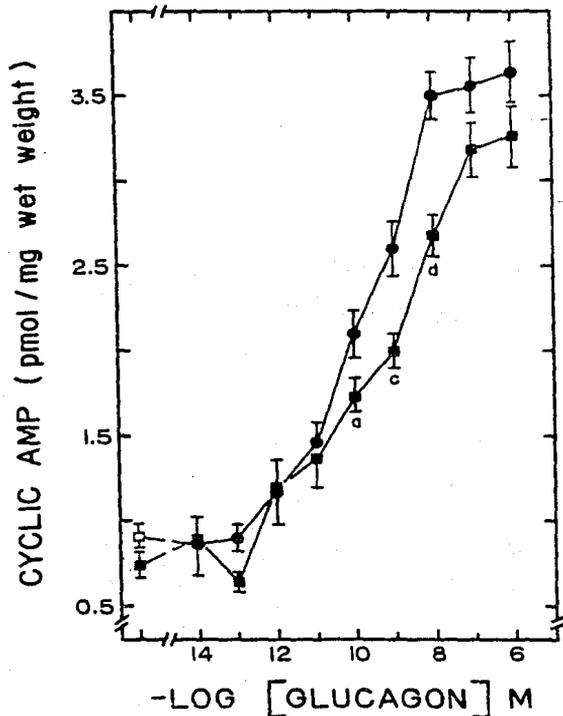


Figura 1.

Curva dosis-respuesta para el efecto de glucagon en la acumulación de AMPc en ausencia (●) y en presencia (■) de angiotensina II 10^{-6} M. Se presenta el promedio de 3 a 6 experimentos en duplicado \pm ES.

a: $p < 0.05$ con respecto al glucagon

b: $p < 0.01$ " " " "

c: $p < 0.005$ " " " "

d: $p < 0.001$ " " " "

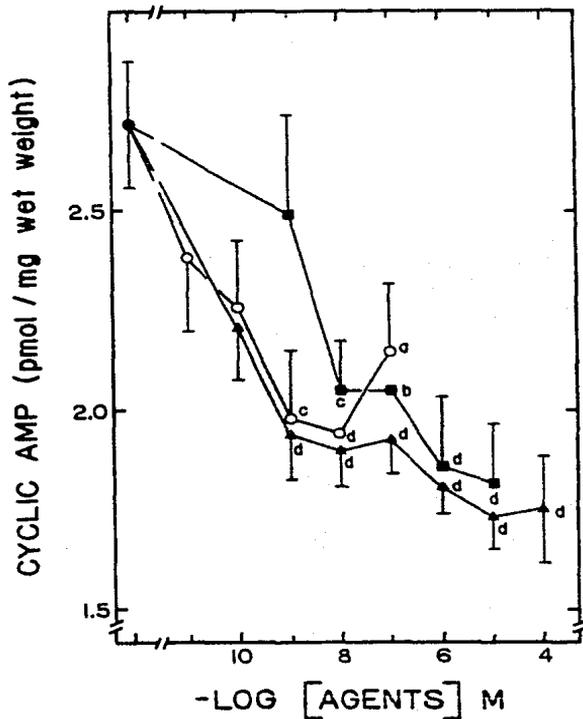


Figura 2.

Curvas de inhibición del efecto de glucagon $10^{-8}M$ sobre la producción de AMPc con dosis crecientes de angiotensina II (■), vasopresina (○) y epinefrina + $10^{-5}M$ propranolol (▲). Se presenta el promedio de 5 experimentos \pm ES.

una disminución de 34.6% en los niveles de AMP cíclico (1.78 ± 0.10 pmol AMP_c/mg peso húmedo).

Ahora bien, para determinar el posible mecanismo de transducción de las hormonas se incubaron los hepatocitos en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato en ausencia de calcio y en presencia de un agente quelante del mismo, el EGTA (0.5 mM) y de un inhibidor de la fosfodiesterasa, la metil-isobutil-xantina, a una concentración de 100 μ M. De nuevo se mantuvo fija la concentración de glucagon (10^{-8} M) y se variaron las dosis de los demás agentes (Cf. figura 3). En primera instancia se observa que la producción de AMP cíclico por el efecto del glucagon es mayor que en los experimentos anteriores: 4.70 ± 0.16 pmol AMP_c/mg peso húmedo con respecto a 2.72 ± 0.16 pmol AMP_c/mg peso húmedo. Por otra parte la angiotensina II presenta de nuevo un comportamiento marcadamente bifásico: la primera fase (de 10^{-12} a 10^{-8} M) es muy semejante a la respuesta obtenida con la epinefrina y la vasopresina, i.e. una pequeña disminución de los niveles de AMP cíclico que sólo en un caso llega a ser significativa. La segunda fase del efecto de la angiotensina II, no observada en los otros casos, es sumamente importante pues los niveles de AMP cíclico se reducen en un 28.1%. Finalmente cabe mencionar que el ionóforo A23187 (10^{-8} M) presenta un efecto parecido a la epinefrina y a la vasopresina: es decir un 12.3% de disminución.

En todos los casos anteriores el valor basal en la producción de AMP cíclico en ausencia y en presencia de los agentes (excluyendo al glucagon) era prácticamente el mismo con la excepción de la epinefrina en el sistema de hepatocitos depletados de calcio. Para estudiar más

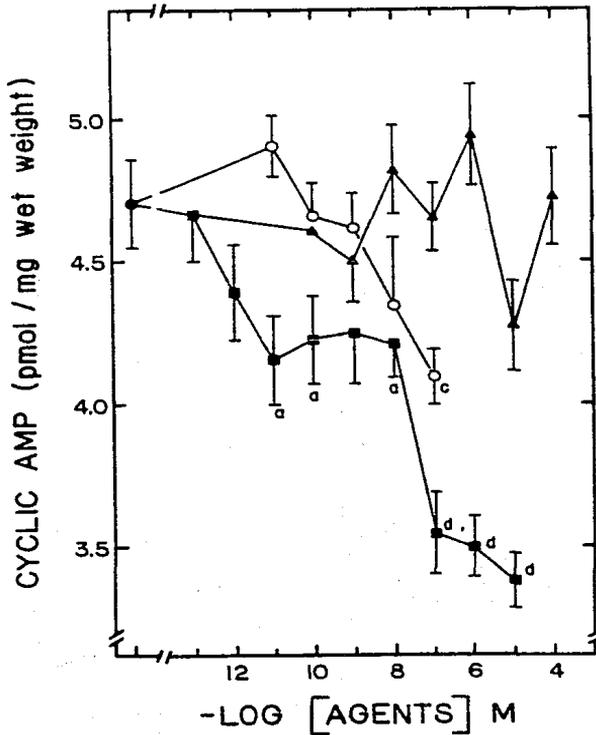


Figura 3.

Curvas de inhibición del efecto de glucagon 10^{-6} M sobre la producción de AMPc con dosis crecientes de angiotensina II (■), vasopresina (○), epinefrina + 10^{-9} M propranolol (▲) en ausencia de calcio (+ 0.5 mM EGTA y 100 μ M Mix). Se presenta el promedio de 6 experimentos \pm ES.

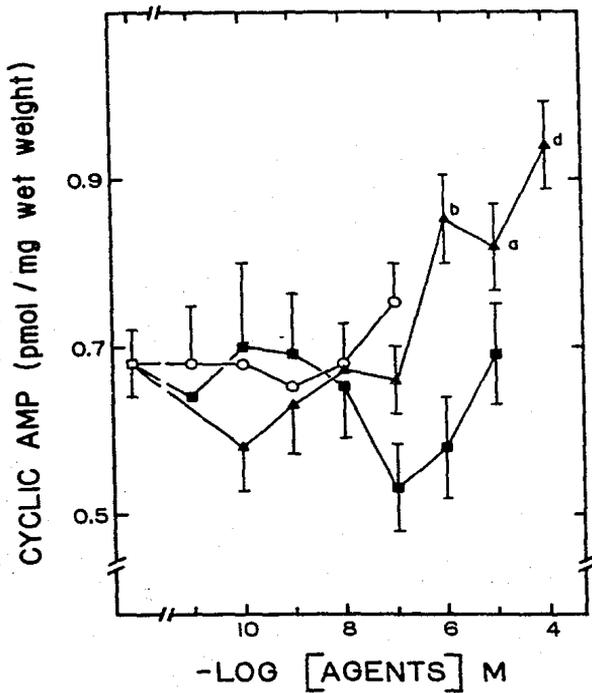


Figura 4.

Curvas dosis-respuesta para el efecto de la angiotensina II (■), la vasopresina (○) y la epinefrina + $10^{-5}M$ propranolol (▲) sobre la producción basal de AMPc en ausencia de calcio (+ 0.5 mM EGTA y 100 μM Mix). Se presenta el promedio de 3 a 7 experimentos \pm ES.

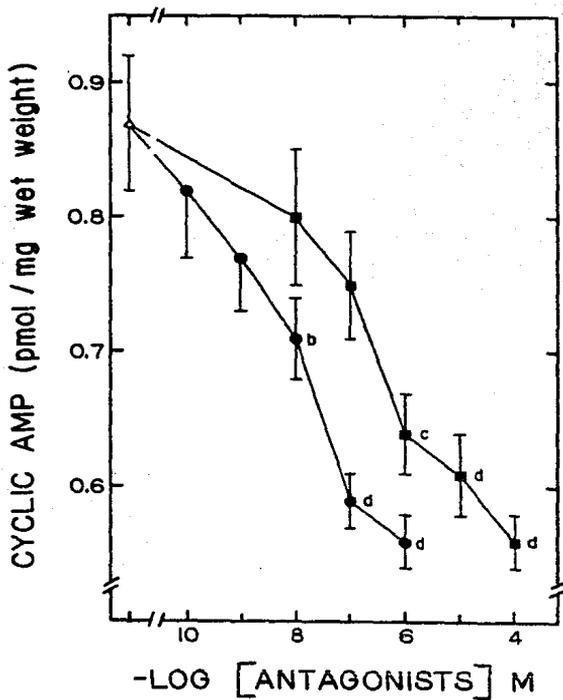


Figura 5.

Inhibición del efecto de $10^{-5}M$ epinefrina + $10^{-5}M$ propranolol sobre la producción de AMPc por dosis crecientes de prazosina (●) y yohimbina (■) en ausencia de calcio (+ 0.5 mM EGTA y 100 μM mix).

detalladamente este fenómeno se incubaron los hepatocitos en ausencia de calcio y en presencia de 0.5 mM de EGTA y 100 μ M MIX, sin glucagon y con dosis crecientes de los agentes (Cf. figura 4). Es posible notar que a concentraciones realmente elevadas la epinefrina ($+ 10^{-5}$ M propranolol) produce un ligero incremento en los niveles de AMP cíclico: 0.94 ± 0.05 pmol/mg peso húmedo con respecto al basal de 0.68 ± 0.04 pmol/mg peso húmedo. Con el fin de determinar la naturaleza de dicho efecto se utilizaron dos antagonistas, uno α_1 -adrenérgico, la prazosina, y otro α_2 -adrenérgico, la yohimbina, en dosis crecientes manteniendo fija la concentración submáxima de epinefrina. Los resultados, mostrados en la figura 5, indican que la prazosina es más potente que la yohimbina para antagonizar el incremento producido por 10^{-5} M epinefrina ($+10^{-5}$ M propranolol) en ausencia de calcio; la diferencia en potencia es aproximadamente de dos órdenes de magnitud (100 veces), y en ambos casos la acción del agonista conduce de nuevo al valor basal (0.62 ± 0.02 pmol AMP_c/mg peso húmedo).

Con el propósito de bloquear la inhibición de la adenilato ciclasa a través de N_1 se decidió utilizar animales tratados con diferentes dosis de toxina pertussis (15, 50 y 100 μ g totales). Los hepatocitos aislados de estos animales se separaron en dos grupos: unos se incubaron en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato con $CaCl_2$ (1.2 mM) y los otros con el mismo amortiguador, sin calcio, con 0.5 mM EGTA y 100 μ M MIX. En todos los casos se mantuvo fija la concentración de glucagon (10^{-8} M) y se agregaron epinefrina más propranolol (10^{-5} M ambos), vasopresina (10^{-8} M), angiotensina II (10^{-6} M) y A23187 (10^{-5} M); los resultados se observan en la figura 6. Es posible notar que, tanto en presencia como en ausencia de calcio, el glucagon produce una menor

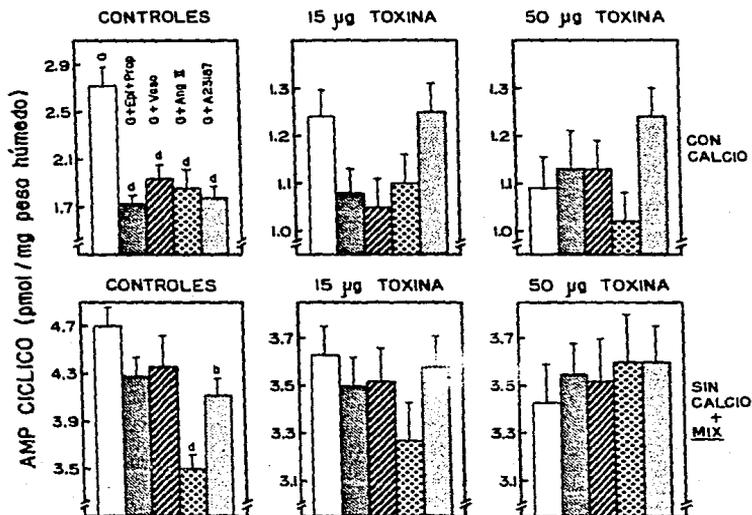


Figura 6.

Efecto de la toxina pertussis y del calcio extracelular sobre la modulación hormonal de los niveles de AMPc. Concentración de los agentes: Glucagon $10^{-8}M$, epinefrina $10^{-5}M$, propranolol $10^{-5}M$, vasopresina $10^{-8}M$, angiotensina II $10^{-6}M$ y A23187 $10^{-5}M$. Se presenta el promedio de 3 experimentos \pm ES.

acumulación de AMP cíclico, y este hecho se acentúa al utilizar dosis crecientes de toxina pertussis. Por otra parte, ninguno de los agentes estudiados provoca una disminución significativa en los niveles de AMP cíclico en los animales tratados, tanto en presencia como en ausencia de calcio; este hecho es independiente de la dosis de toxina utilizada.

D I S C U S I O N

Los resultados obtenidos muestran que el glucagon es capaz de inducir la acumulación de AMP cíclico, probablemente a través de la estimulación de la adenilato ciclasa, puesto que el efecto se observa en hepatocitos incubados tanto en presencia como en ausencia de calcio, y concuerda con los datos publicados por otros autores y nuestro propio laboratorio.

La epinefrina, la angiotensina II y la vasopresina reducen en un 30% estos niveles del nucleótido cíclico en hepatocitos incubados con CaCl_2 1.2 mM y glucagon 10^{-8} M; estos resultados confirman los datos obtenidos en nuestro y otros grupos. El hecho que el ionóforo A23187 sea capaz de reproducir en su misma magnitud el efecto de estas tres hormonas sugiere que el incremento en la concentración intracelular de calcio es el responsable de la disminución de los niveles de AMP cíclico. Esto pudiera ocurrir al activar a la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos y dependiente de calcio y de calmodulina.

Con la finalidad de estudiar más profundamente la acción de la fosfodiesterasa de AMP cíclico se decidió realizar los mismos experimentos en presencia de dos inhibidores de la calmodulina, la trifluoperazina y el W₇. Los resultados obtenidos, no representados en las figuras anteriores, indican que en presencia de calcio la fosfodiesterasa no se bloquea al agregar los inhibidores de la calmodulina en determinadas concentraciones (10^{-5} y 10^{-4} M).

Se ha observado ya con anterioridad que la respuesta de las

hormonas que actúan a través del sistema de transducción de fosfoinosítidos-calcio no se mantiene si los hepatocitos se encuentran depletados de este ión (41). Con la finalidad de bloquear esta vía y la activación consecuente de la fosfodiesterasa, los hepatocitos se incubaron en ausencia de calcio y en presencia de un agente quelante del mismo (EGTA), así como en presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMP cíclico, la metil-isobutil-xantina (MIX) y de glucagon. Los resultados muestran en primera instancia que la acumulación de AMP cíclico producida por el glucagon es mayor que en los experimentos anteriores, lo que indica que en condiciones normales, i.e. en presencia de calcio, la fosfodiesterasa se encuentra activada y degrada cierta cantidad del nucleótido producido por la estimulación de la adenilato ciclasa. Por otra parte, en estas condiciones (sin calcio), el efecto de la epinefrina, de la vasopresina y del ionóforo A23187 es muy pequeño y similar a la respuesta obtenida con bajas concentraciones de angiotensina II (hasta 10^{-8} M); estos procesos, en el caso de las hormonas, involucran muy probablemente el recambio de fosfoinosítidos y la liberación de calcio intracelular.

Sin embargo, a concentraciones superiores a 10^{-8} M, la angiotensina II reduce muy significativamente los niveles de AMP cíclico producido por la respuesta al glucagon, efecto que no se observa con las otras dos hormonas y que puede deberse a la inhibición de la adenilato ciclasa. De hecho ya se había observado, en otros tejidos, que la angiotensina II podía actuar por un mecanismo de transducción, por el otro o por ambos a la vez (músculo vascular, células de la pituitaria, tejido hepático) (22,65,66,72,73,74,75). En nuestro caso particular la respuesta bifásica observada ya se había

obtenido en los experimentos anteriores (Cf. figura 2) y sugiere que en este tejido, a bajas concentraciones la angiotensina II actúa al activar a la fosfodiesterasa (sistema fosfoinosítidos-calcio) mientras que, a concentraciones superiores, inhibe a la adenilato ciclasa a través de N_1 ; estos datos confirman de alguna manera las hipótesis de Gunther (65), García-Sáinz (67) y otros, aunque no permiten distinguir si se trata de una o dos poblaciones de receptores acoplados a los distintos sistemas de transducción.

Ahora bien, en los experimentos realizados en presencia de calcio, la vasopresina, la angiotensina II y la epinefrina, si bien disminuyen la acumulación de AMP cíclico inducida por el glucagon, no modifican el valor basal del nucleótido. Sin embargo, en los hepatocitos depletados de calcio, la epinefrina produce, en ausencia de glucagon, un incremento significativo; los resultados obtenidos al realizar la dosis-respuesta de los agentes en estas condiciones confirmaron un incremento del 38% producido por la epinefrina con respecto al basal (Cf. figura 4). Este efecto no es atribuible a una respuesta β -adrenérgica pues los hepatocitos se incubaron en presencia de un antagonista β -adrenérgico, el propranolol, en una concentración adecuada (10^{-5} M). Dicha acumulación de AMP cíclico en hepatocitos depletados de calcio, bajo condiciones de bloqueo de los receptores β -adrenérgicos, ya había sido reportada anteriormente por Chan y Exton (76,77). Los resultados obtenidos en la figura 5 indican que se trata de una acumulación mediada probablemente por receptores del tipo α_1 -adrenérgico, puesto que esta respuesta es antagonizada a concentraciones bajas de prazosina. Como se mencionó anteriormente en el laboratorio se tiene la hipótesis de la existencia de dos mecanismos

de acción para los receptores α_1 -adrenérgicos (51 a 59):

* Un mecanismo dependiente de calcio extracelular, compartido por la vasopresina y la angiotensina II, acoplado al recambio de fosfoinosítidos, insensible a la inhibición por insulina y regulado por hormonas tiroideas.

* Un mecanismo independiente de calcio extracelular, no compartido con las otras dos hormonas, sensible a la inhibición por insulina y modulado por glucocorticoides (predomina en ratas hipotiroideas).

Ahora bien, las condiciones en las que se observó la acumulación de AMP cíclico inducida por la epinefrina sugieren que se trata del segundo mecanismo de acción; éste predomina en las ratas hipotiroideas, y cabe mencionar que en los hepatocitos aislados de estos animales tratados se ha logrado observar un incremento similar en los niveles de AMP cíclico (J. Iñiguez-Lluhi, J.A. García-Sáinz, datos no publicados): es decir, este mecanismo se hace notorio en hepatocitos depletados de calcio provenientes de ratas controles, así como en hepatocitos de ratas hipotiroideas. Finalmente es interesante hacer notar que en otros sistemas se ha encontrado también que la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos provoca diferentes respuestas: en el cerebro de rata, por ejemplo, Johnson y Minneman han estudiado estos efectos y han llegado a la conclusión de que existen marcadas diferencias entre los receptores α_1 -adrenérgicos involucrados en las distintas respuestas (78,79).

Se postuló anteriormente la hipótesis que confería a la angiotensina II la capacidad de inhibir a la adenilato ciclasa; una de las maneras más comunmente utilizadas para demostrar este efecto radica en el empleo de la toxina pertussis, ya que ésta inactiva a la proteína

N_1 al provocar su ADP-ribosilación. Si, por otra parte, se realizan los experimentos en hepatocitos depletados de calcio y con inhibidor de la fosfodiesterasa, el efecto de la angiotensina II se bloquearía totalmente. Los resultados obtenidos (Cf. figura 6) muestran, en primer lugar, que la acumulación de AMP cíclico inducida por el glucagón se encuentra disminuida con respecto a los animales controles (un efecto que también observó Garrison)(75), y este efecto es proporcional, en apariencia, a la cantidad de toxina utilizada; esto sugiere que, de alguna manera, la toxina produce efectos nocivos en los animales, y por ende, afecta también a las células del tejido hepático. Cabe aclarar que ningún animal murió a consecuencias del tratamiento pero la viabilidad de los hepatocitos se encontraba disminuida con respecto a los que provenían de animales controles.

Por otra parte en los hepatocitos depletados de calcio y aislados de animales tratados se obtuvo la respuesta esperada, i.e. ni la epinefrina, ni la angiotensina II, ni la vasopresina, ni el ionóforo disminuyeron la acumulación de AMP cíclico estimulada por el glucagón, lo que confirma la hipótesis de que, en estas condiciones, las dos vías se encuentran interrumpidas en algún punto (activación de la fosfodiesterasa, inhibición de la adenilato ciclasa por N_1). Sin embargo, en presencia de calcio, el sistema de transducción que involucra el rescambio de fosfoinosítidos y la liberación consecuente de calcio no se encuentra bloqueado, aún cuando los animales hayan sido tratados con la toxina pertussis pues, en hígado, ésta afecta, aparentemente, sólo a N_1 (García-Sáinz, Exton y otros autores)(20,22). Sorprendentemente, en este sistema, ninguno de los agentes mencionados anteriormente disminuye significativamente los niveles de AMP cíclico

producidos por la estimulación del glucagon: este resultado, totalmente inusitado, indica que la toxina no sólo modifica a N_1 en el hígado, sino que también altera la respuesta de las hormonas que actúan por el mecanismo de fosfoinosítidos-calcio. A continuación se proponen varias hipótesis para tratar de explicar este fenómeno:

1) Es posible que la toxina altere de alguna manera la fosfodiesterasa de AMP cíclico evitando así la degradación del nucleótido. Sin embargo, esto parece poco probable ya que la fosfodiesterasa se encuentra activa pues en ausencia de calcio y en presencia de su inhibidor, la metil-isobutil-xantina, los niveles de AMP cíclico producidos por el efecto del glucagon se incrementan en los hepatocitos de animales tratados, exactamente de la misma manera que en los animales controles.

2) Es posible que la toxina modifique la proteína " N_1 " hipotética involucrada en este sistema de transducción. Sin embargo existen varios reportes que indican que, en el hígado de rata, la toxina pertussis produce la ADP-ribosilación de una proteína de 41 kDa, correspondiente a N_1 . Además no se altera la acción de los agentes α_1 -adrenérgicos, de la vasopresina y de la angiotensina II sobre el recambio de fosfoinosítidos (20,23,75). Por otra parte el ionóforo carece de efecto inhibitorio al igual que las hormonas en los animales tratados y no ejerce su acción a través de esta proteína " N_1 "...

3) Es posible que la toxina modifique el influjo de calcio extracelular. Se ha observado que el efecto de las hormonas que actúan por este mecanismo se mantiene en presencia de calcio extracelular (41); ciertos autores han sugerido que, en algunos sistemas, la liberación de calcio intracelular, consecuente al efecto del inositol

trifosfato sobre el retículo endoplásmico activa a una proteína cinasa que convierte al mensajero en inositol 1,3,4,5 tetrafosfato y este, de alguna forma estimularía la entrada de calcio extracelular (80,81). En ciertas células de las glándulas suprarrenales, Kojima et al demostraron que la toxina pertussis bloqueaba el influjo de calcio estimulado por la angiotensina II (82). Sin embargo, de nuevo en nuestro sistema, los datos obtenidos con el ionóforo hacen muy poco probable esta hipótesis, al igual que descarta la posibilidad de que la toxina modifique la posible proteína involucrada en el sistema IP₂-liberación de calcio.

4) Finalmente, pudiera ser que el ionóforo estuviera involucrado en otros procesos además del incremento en la concentración intracelular de calcio, y que éstos, de alguna manera, fueran sensibles a la toxina pertussis. Por ejemplo, la fosfolipasa A₂ es capaz de liberar ácido araquidónico de los polifosfoinosítidos, y éste, a su vez, puede generar prostaglandinas por medio de la acción de la ciclo-oxigenasa; en la línea celular FRTL5, derivada de la tiroides de rata, Axelrod (24) encontró que las proteínas que unen nucleótidos de guanina y que se encuentran acopladas a la fosfolipasa A₂ son sensibles a la acción de la toxina. Pudiera pensarse entonces que el ácido araquidónico o alguno de sus productos generados por la ciclo-oxigenasa tuvieran un efecto directo sobre la fosfodiesterasa, y en consecuencia sobre la acumulación de AMP cíclico, y que la activación de la fosfolipasa A₂ dependiera del ionóforo A23187. De hecho, recientemente se ha encontrado que el ionóforo puede promover la hidrólisis de los fosfoinosítidos en ciertas células en cultivo y que esta acción participa en forma importante en los efectos del ionóforo (83).

De cualquier manera, el efecto general de la toxina pertussis sobre la modulación de los niveles de AMP cíclico en los hepatocitos de rata no se ha caracterizado completamente. Los efectos observados no parecen deberse exclusivamente a la sola modificación de la proteína N_1 . Evidentemente este es el hallazgo más importante de la presente tesis; la localización del sitio preciso de acción es de enorme interés para el grupo de trabajo y se está trabajando en ello.

C O N C L U S I O N E S

* En presencia de calcio la angiotensina II, la vasopresina y la epinefrina disminuyen los niveles de AMP cíclico producido por el efecto del glucagon.

* En ausencia de calcio la angiotensina II muestra una respuesta bifásica: en una primera parte abate los niveles de AMP cíclico de una manera semejante al efecto de la vasopresina, la epinefrina y el ionóforo A23187. La segunda fase representa una disminución muy marcada no observada con las otras hormonas y que corresponde, probablemente, a la inhibición de la adenilato ciclasa.

* En presencia de calcio ninguna de las tres hormonas afecta los valores basales de AMP cíclico; sin embargo, en ausencia de calcio, la epinefrina es capaz de estimular la producción de AMP cíclico, aparentemente por medio de receptores α_1 -adrenérgicos.

* Sorprendentemente la toxina pertussis bloquea la modulación hormonal ejercida por la angiotensina II, la vasopresina, la epinefrina y el ionóforo A23187, tanto en presencia como en ausencia de calcio. Los resultados indican que la toxina produce efectos que no se explican por la ADP-ribosilación de N_r , pues evita la disminución de los niveles de AMP cíclico producido por las hormonas, en presencia de calcio.

B I B L I O G R A F I A

1. Snyder, S. 1985. *Sci.Amer.Vol 253* (4):114-123.
2. Berridge, M.J. 1985. *Sci.Amer.Vol 253* (4):124-134.
3. Moxham, C., George, S.T., Graziano, M.P., Brandwein, H.J. and C.C. Malbon. 1986. *J.Biol.Chem.Vol 261*:14562-14570.
4. Robishaw, J.D., Smigel, M.D. and A.G.Gilman. 1986. *J.Biol.Chem.Vol 261* 9587-9590.
5. Northup, J.K. 1985. in "*Molecular mechanisms of transmembrane signalling*" (Cohen and Houslay, Eds). Elsevier. Netherlands. 91-116.
6. Klee, W.A., Milligan, G., Simonds, W.F. and B.Tocque. 1985. in "*Molecular mechanisms of transmembrane signalling*" (Cohen and Houslay, Eds). Elsevier. Netherlands. 117-129.
7. Garcia-Sáinz, J.A. 1985. La toxina pertussis. *Ciencia Vol 36*:97-103.
8. Birnbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Cerione, R.A., Hildebrant, J.D., Sunyer, T., Rojas, F.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and R.Iyengar. 1985. in "*Molecular mechanisms of transmembrane signalling*" (Cohen and Houslay, Eds). Elsevier. Netherlands. 131-182.
9. Helmreich, E.J.M. and T.Pfeuffer. 1985. *Trends in Pharm.Sci.Vol 6*:438-443.
10. Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T. and M.Ui. 1982. *Biochem.Vol 21*:5516-5522.
11. Ui, M., Nogimori, K. and M.Tamura. 1985. in "*Pertussis Toxin*" (Sekura, Moss and Vaughan, Eds). Academic Press. USA. 19-44.
12. Ui, M. 1984. *Trends in Pharm.Sci. Vol 5*: 277-279.
13. Moss, J., Vaughan, M. and E.L.Hewlett. 1985. in "*Pertussis Toxin*" (Sekura, Moss and Vaughan, Eds). Academic Press. USA. 105-128.
14. Malbon, C.C., Rapiejko, P.J. and J.A.Garcia-Sáinz. 1984. *FEBS Vol*

- 176: 301-306.
15. Rapiejko, P.J., Northup, J.K., Evans, T., Brown, J.E. and C.C. Malbon. 1986. *Biochem. J. Vol 240*:35-40.
 16. Garcia-Sáinz, J.A. 1985. in "Pertussis Toxin" (Sekura, Moss and Vaughan, Eds). Academic Press. USA. 205-224.
 17. Kurose, H., Katada, T., Amano, T. and M. Ui. 1983. *J. Biol. Chem. Vol 258*: 4870.
 18. Kuno, T., Shirakawa, O. and C. Tanaka. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 115*:325.
 19. Cote, T.E., Frey, E.A. and R.D. Sekura. in "Pertussis Toxin" (Sekura, Moss and Vaughan, Eds). Academic Press. USA. 131-147.
 20. Pushpendran, C.K., Corvera, S. and J.A. Garcia-Sáinz. 1983. *FEBS Vol 160*: 198-202.
 21. Fain, J.N. and M.J. Berridge. 1979. *Biochem. J. Vol 180*:655-661.
 22. Lynch, C.J., Prpic, V., Blackmore, P.F. and J. Exton. 1985. *Mol. Pharmacol. Vol 29*:196-203.
 23. Uhing, R.J., Prpic, V., Jiang, H. and J.H. Exton. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*:2140-2146.
 24. Burch, R., Luini, A. and J. Axelrod. 1986. *Natl. Acad. Sci. Vol 83*:7201-7205.
 25. Kikuchi, A., Kozawa, O., Kalbuchi, K., Katada, T., Ui, M. and Y. Takai. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*:11558-11562.
 26. Kanaide, H., Matsumoto, T. and M. Nakamura. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol 140*:195-203.
 27. Downes, P.C. and R.H. Mitchell. 1985. in "Molecular mechanisms of transmembrane signalling" (Cohen and Houslay, Eds). Elsevier. 3-56.
 28. Deckmyn, H., Tu, S-M. and P.W. Majerus. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*:

16553-16558.

29. Lapetina, E.G. 1982. *Trends in Pharmacol. Sci.* 3:115-118.
30. Neufeld, E.J. and P.W. Majerus. 1983. *J. Biol. Chem. Vol 258*:2461-2467.
31. Irvine, R.F. 1982. *Biochem. J. Vol 204*:3-16.
32. Chau, L.Y. and H-H. Tai. 1981. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 1688-1694.
33. Prescott, S.M. and P.W. Majerus. 1983. *J. Biol. Chem. Vol 258*:754-769.
34. Dixon, J.F. and L.E. Hokin. 1984. *J. Biol. Chem. Vol 259*:14418-14425.
35. Joseph, S.K. and J.R. Williamson. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*:14658-14664.
36. Gill, D.L., Ueda, T., Chueh, S-H. and M.W. Noel. 1986. *Nature Vol 320*:461-464.
37. Chueh, S-H. and D.L. Gill. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*:13883-13886.
38. Garrison, J.C., Borland, M.K., Florio, V.A. and D.A. Twible. 1979. *J. Biol. Chem. Vol 254*:7147-7156.
39. Keppens, S., Vandenheede, J.R. and H. de Wulf. 1977. *Biochem. Biophys. Acta Vol 496*:448-457.
40. Woods, N.M., Cuthberston, K.S.R. and P.H. Cobbold. 1986. *Nature Vol 319*:600-602.
41. Joseph, S.K., Coll, K.E., Thomas, A.P., Rubin, R. and J.R. Williamson. 1985. *J. Biol. Chem. Vol 260*:12508-12515.
42. Erneux, C., Van Sande, J., Miot, F., Cochaux, P., Decoster, C. and J.E. Dumont. 1985. *Mol. Cell. Endocrinol. Vol 43*:123-134.
43. Goodman, L.S. y A. Gilman. 1978. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Interamericana. México. 1412 pp.
44. Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Pelton, J.T., Hruby, V.J., Trivedi, D. and J.A. Garcia-Sáinz. 1984. *Biochim. Biophys. Acta Vol 804*:434-441.

45. Petersen, O.H. and C. Bear. 1986. *Nature Vol 323*:18.
46. Wakelam, M.J.O., Murphy, G.J., Hruby, V.J. and M.D. Houslay. 1986. *Nature Vol 323*:68-71.
47. Keppens, S. and H. de Wulf. 1975. *FEBS Lett. Vol 51*:29-32.
48. Guillon, G., Balestre, M-N., Mouillac, B. and G. Devilliers. 1986. *FEBS Vol 196*:155-159.
49. Fain, J.N. and J.A. Garcia-Sáinz. 1980. *Life Sci. Vol 26*:1183-1194.
50. Lomasney, J.W., Leeb-Lundberg, L.M., Cotecchia, S., Regan, J.W., De Bernadis, J.F., Caron, M.G. and R.J. Lefkowitz. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261*: 7710-7716.
51. Corvera, S. and J.A. Garcia-Sáinz. 1983. *FEBS Lett. Vol 153*:366-368.
52. Hernández-Sotomayor, S.M.T. and J.A. Garcia-Sáinz. 1984. *FEBS Lett. Vol. 166*:385-388.
53. Garcia-Sáinz, J.A. and S.M.T. Hernández-Sotomayor. 1985. *Proc. Natl. Acad. Sci. Vol 82*:6727-6730.
54. Garcia-Sáinz, J.A., Tussié-Luna, M.I. and S.M.T. Hernández-Sotomayor. 1986. *Biochem. Biophys. Acta 887*:69-72.
55. Garcia-Sáinz, J.A., Tussié-Luna, M.I. and S.M.T. Hernández-Sotomayor. 1986. *Biochem. Biophys. Acta 887*:73-79.
56. Hernández-Sotomayor, S.M.T. 1987. *Mecanismo de acción de los receptores alfa 1-adrenérgicos*. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica, UNAM.
57. Pushpendran, C.K., Corvera, S. and J.A. Garcia-Sáinz. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol 118*:451-459.
58. Huerta-Bahena, J. and J.A. Garcia-Sáinz. 1985. *Biochem. Biophys. Acta Vol 845*:131-137.
59. Garcia-Sáinz, J.A. and J.L. Contreras-Rodríguez. 1986. *European J.*

- Pharmacol. Vol 125:103-110.*
60. Sen, I., Jim, K.F. and R.L. Soffer. 1983. *Eur. J. Biochem. 136:41-49.*
 61. Guillemette, G., Guillon, G., Marie, J., Pantaloni, C., Balestre, M.N., Escher, E. and S. Jard. 1984. *J. Recep. Res. 4:267-281.*
 62. Sen, I. 1985. *Biochem. Biophys. Acta 813:103-110.*
 63. Campanile, C.P., Crane, J.K., Peach, M.J. and J.C. Garrison. 1982. *J. Biol. Chem. Vol 257:4951-4958.*
 64. Crane, J.K., Campanile, C.P. and J.C. Garrison. 1982. *J. Biol. Chem. Vol 257:4949-4965.*
 65. Gunther, S. 1984. *J. Biol. Chem. Vol 259:7622-7629.*
 66. Cárdenas-Tanús, R., Huerta-Bahena, J. and J.A. García-Sáinz. 1982. *FEBS Lett. Vol 143:1-4.*
 67. García-Sáinz, J.A. 1987. *Trends in Pharm. Sci. Vol 8:48-49.*
 68. Berry, M.N. and D.S. Friend. 1969. *J. Cell. Biol. 43:506-520.*
 69. Tolbert, M.E., White, A.C., Aspry, K., Cutts, J. and J.N. Fain. 1980. *J. Biol. Chem. Vol 255:1938-1944.*
 70. Gilman, A.G. 1970. *Procl. Natl. Acad. Sci. USA. Vol 67:305-312.*
 71. Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, R.P., Sgherzi, A.M. and A.M. Tampion. 1971. *Biochem. J. 121:561-562.*
 72. Anaud-Srivastava, M.B. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:420-428.*
 73. Enjalbert, A., Sladeczek, F., Guillon, G., Bertrand, P., Shu, C., Epelbaum, J., García-Sáinz, J.A., Jard, S., Loubard, C., Kordon, C. and J. Bockaert. 1986. *J. Biol. Chem. Vol 261:4071-4075.*
 74. Jard, S., Cantau, B. and K.H. Jakobs. 1981. *J. Biol. Chem. Vol 256:2603-2606.*
 75. Pobiner, B.F., Hewlett, E.L. and J.C. Garrison. 1985. *J. Biol. Chem. Vol 260:16200-16209.*

70. Chen, T.M. and J.H. Exton. 1977. *J. Biol. Chem.* Vol 252:8645-8651.
77. Morgan, N.G., Blackmore, P.F. and J.H. Exton. 1982. *J. Biol. Chem.* Vol 258:5103-5109.
78. Johnson, R.D. and K.P. Minneman. 1986. *European J. Pharmacol* 129:293-305.
79. Johnson, R.D. and K.P. Minneman. 1987. *Mol. Pharmacol* 31: in press.
80. Irvine, R.F. and Moor, R.M. 1986. *Biochem. J.* 240:917-920.
81. Houslay, M.D. 1987. *Trends in Biochem. Sci.* Vol 12:1-2.
82. Kojima, I., Shibata, H. and E. Ogata. 1986. *FEBS Lett.* Vol 204:347-351.
83. Lo, T.N., Saul, W. and M.A. Beaven. 1987. *J. Biol. Chem.* Vol 262:4141-4145.