



111
2ej.
Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**MODULACION DE LAS RESPUESTAS
B-ADRENERGICA Y AL GLUCAGON POR
LOS ESTERES DEL FORBOL**

TESIS DE LICENCIATURA

Que para obtener el Título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

MARINA MACIAS SILVA

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	25
RESULTADOS	31
DISCUSION	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUCCION

Los seres vivos tienen la capacidad de percibir cambios en su medio ambiente y de responder a ellos. Esta respuesta o adaptación requiere, en los seres pluricelulares, de la acción de diversas sustancias que el mismo organismo produce. Dichas sustancias y sus sitios de acción, así como de producción, representan un sistema de comunicación entre las diferentes células del organismo. Este sistema está formado de células emisoras, cuyos productos de secreción son los "mensajes", y de los sitios sobre los que actúan que son los llamados órganos o tejidos "blanco", en donde se encuentran sus receptores.

Es conocido que los organismos "superiores" poseen dos grandes sistemas de intercomunicación -el nervioso y el endócrino- los cuales les permiten funcionar de manera integrada y coordinada, estos sistemas funcionan como uno solo denominado sistema neuroendócrino. Aunque ambos sistemas tienen similar origen embriológico y utilizan mensajeros químicos en la comunicación celular, difieren en su modo de acción, los mensajes nerviosos actúan de forma más rápida y directa que los mensajes endocrinos (1).

Los mensajeros químicos que emplean las células para comunicarse pueden estar en contacto con cualquier célula, pero sólo algunas de ellas serán capaces de recibir el mensaje y dar una respuesta. Estos mensajeros

pueden agruparse en tres clases: péptidos, como el glucagon y la insulina; lípidos, con una estructura química similar a la del colesterol, como los glucocorticoides y otros esteroides; y aminas, entre las que se encuentran las catecolaminas: adrenalina, noradrenalina y dopamina (2), así como ciertos aminoácidos o sus derivados como el ácido glutámico, la glicina, el GABA y las hormonas tiroideas, entre otros.

En 1906 Langley al estudiar la unión mioneural como el sitio de acción de la nicotina y del curare, interpretó el antagonismo entre estos agentes como resultado de un mutuo desplazamiento por el mismo sitio de acción, introduciendo así el concepto de "receptor" (3,4).

Los receptores celulares son proteínas de alto peso molecular, de los que se conocen dos tipos principales: los que están en la superficie celular ó receptores de membrana, que generalmente están glucosilados, y los que se encuentran en el interior celular. Sus funciones principales son reconocer al mensajero químico y participar en la transmisión del mensaje hacia la ejecución de una acción específica.

La naturaleza química de los mensajeros guarda cierta relación con el tipo de receptor sobre el cual van a actuar: los mensajeros de naturaleza peptídica y las aminas actúan sobre receptores membranales, en cambio, los de naturaleza lipídica, por ser hidrofóbicos pueden

atravesar la membrana plasmática e interactuar con los receptores intracelulares; sin embargo, existen excepciones.

Los receptores celulares son altamente específicos, ya que únicamente aceptan o reciben un tipo determinado de mensaje; esta selectividad se debe principalmente a la afinidad que se establece entre el mensajero y el receptor, debido a su complementaridad estereoquímica. A las moléculas químicas, que hacen las veces de mensajeros se les divide en antagonistas y agonistas, según eviten o mimeticen las acciones del mensajero natural. Si bien ambas moléculas son capaces de unirse al receptor, sólo los agonistas pueden activarlo. Una vez que el receptor ha sido activado se inicia un proceso de transducción del mensaje que lleva a la formación de un segundo mensajero intracelular y a la propagación de la señal que culminará con el o los efectos finales (5).

Se conocen a la fecha dos mecanismos principales de transducción de la señal hormonal: el sistema de la adenilato ciclasa y el sistema fosfoinosítidos-Ca⁺⁺.

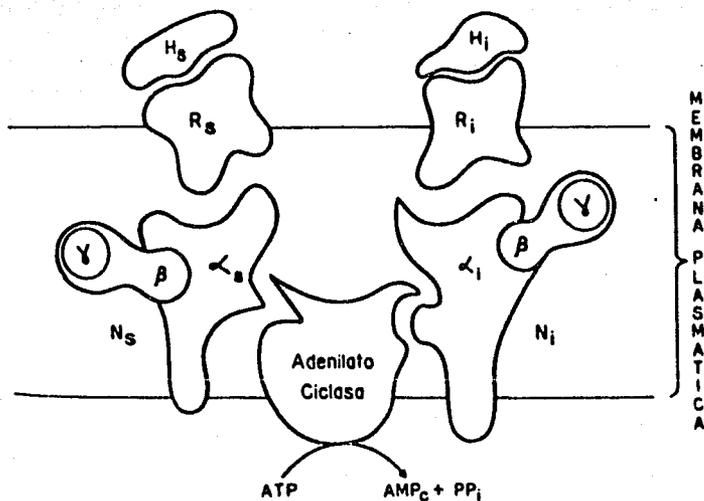
SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

Existen muchas hormonas que modulan los niveles intracelulares de AMP cíclico, algunas los incrementan como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), el glucagon, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) y otras los disminuyen como la

acetilcolina, los péptidos opioides y la somatostatina (6). Además hay hormonas que a través de diferentes receptores inducen ambas acciones, como por ejemplo la epinefrina.

Sutherland y su grupo fueron los primeros en observar esta modulación en los niveles de AMP cíclico por la acción hormonal, a partir de entonces el sistema de la adenilato ciclase ha sido el más estudiado. Posteriormente el grupo de Rodbell observó que el sistema requería de GTP y propusieron la existencia de una proteína "G" (fijadora de guanil-nucleótidos), encargada de acoplar los receptores a la adenilato ciclase (7). En la actualidad se sabe que el sistema consta de cinco componentes (Ver esquema 1): 1) receptores estimulatorios para la hormona (R_s), 2) receptores inhibitorios para la hormona (R_i), 3) proteína estimuladora fijadora de guanil-nucleótidos (G_s), 4) proteína inhibidora fijadora de guanil-nucleótidos (G_i) y 5) el componente efector, la enzima adenilato ciclase generadora de AMP cíclico a partir de la hidrólisis de ATP (8).

Las proteínas "G" (G_s o G_i), también llamadas proteínas "N" (N_s o N_i), cada una va a estar constituida de tres subunidades: α , β y γ . Las subunidades α , con un peso molecular de 39 a 52 kDa son los sitios de fijación e hidrólisis del GTP. La subunidad α de G_s estimula a la adenilato ciclase, mientras que respecto a la de G_i existe controversia de un efecto directo, sin embargo

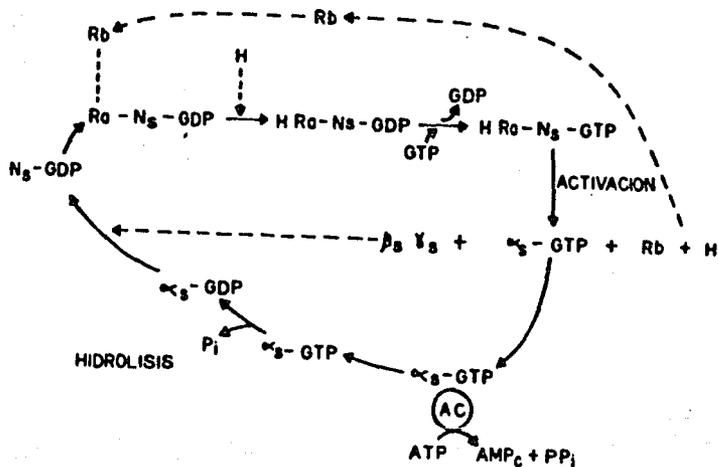


Esquema 1. Modelo del sistema de la adenilato ciclasa. H_s , hormona estimulante; R_s , receptor estimulador; N_s , proteína G estimuladora (subunidades α , β y γ); H_i , hormona inhibitoria; R_i , receptor inhibitorio; N_i , proteína G inhibitoria (subunidades α_1 , β y γ).

puede mitigar la inhibición por el complejo $\beta\gamma$ que ejerce sobre la adenilato ciclasa (9). Estas proteínas "G", además de su actividad de GTPasas y de fijar nucleótidos de guanina, también fijan ciertos iones como el magnesio y el flúor (6). Se sabe que la forma activa de estas proteínas es aquella que tiene fijo al GTP y se inactiva al hidrolizarlo. Por otra parte, se ha encontrado que son sustrato de ciertas toxinas bacterianas con actividad de ADP-ribosiltransferasa.

En el esquema 2, se presenta el modelo que se ha propuesto para explicar la interacción del complejo hormona-receptor con la adenilato ciclasa a través de las proteínas G.

En estado basal las proteínas Gs se encuentran formadas por un trímero las subunidades α , β y γ asociadas, unido a GDP y asociado al receptor, lo que hace que éste se encuentre en estado de alta afinidad para agonistas (Ra), de tal manera que se encuentran formando el complejo Ra-Gs-GDP. Cuando el agonista (H) se une a dicho complejo el GDP es sustituido por GTP entonces el agonista es liberado para volver a estimular o bien ser degradado y el receptor se disocia pasando a un estado de baja afinidad. La proteína G se activa, y se disocia en las subunidades $\beta\gamma$ y en el complejo α s-GTP, el cual es capaz de activar a la adenilato ciclasa. Como se mencionó anteriormente la subunidad alfa es la que posee la actividad GTPásica de forma que hidroliza al GTP que



Esquema 2. Modelo cinético para la activación de la adenilato ciclasa. Ra, receptor en estado de alta afinidad; Rb, receptor en estado de baja afinidad; Ns, proteína G acopladora; (subunidades α_s , β_s y γ_s); H, hormona.

lleva unido, a GDP más fosfato inorgánico y queda en la forma α -GDP, la cual vuelve a asociarse a las subunidades $\beta\gamma$ y luego al receptor de baja afinidad (Rb) y se vuelve a formar el complejo Rb-Gs-GDP, para reiniciar el ciclo (5).

De una manera muy similar se cree que actúa la proteína G_i , sólo que en lugar de activar a la adenilato ciclasa, la inhibe. Algunos autores proponen que el complejo α_i -GTP es capaz de interactuar con la unidad catalítica de la ciclasa y así inhibirla (78), mientras que otros proponen que el complejo $\beta\gamma$ liberado por activación de G_i puede asociarse con α_s y así evitar la activación de la ciclasa (79). De tal forma que la acción de la adenilato ciclasa se ve como la sumatoria de las acciones inhibitorias y estimulatorias que sobre ella actúan.

Una vez que la adenilato ciclasa es activada, hidroliza el ATP y forma AMP cíclico más fosfato inorgánico; al generarse así el segundo mensajero AMP cíclico, este iniciará una cascada de reacciones, que incluyen la activación de la proteína cinasa A (PKA), que llevarán a la ejecución de la orden o señal contenida en el mensaje. Aunque aumenta rápidamente la concentración de AMPc en la célula por la acción hormonal, los niveles de AMPc descienden debido a la acción de una enzima responsable de su degradación, la fosfodiesterasa, que cataliza la hidrólisis del AMPc a 5'fosfato de adenosina (22).

En el estudio de este sistema se han empleado algunos agentes que han servido para aclarar este mecanismo de transducción, al permitir estudiar al sistema a través de sus partes. Uno de estos agentes es la forskolina, que es una molécula orgánica, aislada de las raíces de la planta Coleus forskohlii, que se sabe activa directamente a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, al pasar por alto al receptor y a la proteína G (1). Otros agentes son los análogos no hidrolizables del GTP, como por ejemplo el Gpp(NH)p, que se unen irreversiblemente a las proteínas G las activan y hacen que interaccionen con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa (8). Se ha observado que el GTP y sus análogos tienen un efecto bifásico sobre la actividad de la adenilato ciclasa, es decir en bajas concentraciones la estimulan y en altas concentraciones la inhiben (7).

En el estudio del sistema de la adenilato ciclasa, también han sido importantes dos toxinas bacterianas: a) La toxina pertussis, producida por el agente causal de la tosferina, la Bordetella pertussis; y b) La toxina del cólera, producida por el Vibrio cholerae, agente causal del cólera.

El empleo de dichas toxinas ha sido muy importante en la caracterización de las proteínas acopladoras G. Estas toxinas catalizan una modificación covalente en las proteínas G utilizando NAD les transfieren la fracción de ADP-ribosa. La acción de ambas toxinas es sinérgica, la

toxina del cólera ADP-ribosila a la subunidad α de la protefna Gs, provoca la disociación del complejo $\beta\gamma$ y baja afinidad por el mismo. Esto provoca que α s quede permanentemente activada y en posibilidad de interaccionar con la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, a la que activa continuamente. Por otro lado la toxina pertussis ADP-ribosila a la subunidad α de la protefna Gi, induciendo su disociación del complejo $\beta\gamma$ impidiendo que se vuelvan a reasociar, esto trae como consecuencia que los receptores acoplados inhibitoriamente a la ciclasa permanezcan en estado de baja afinidad. Al estar α i permanentemente activada se esperaría que estuviera ejerciendo su efecto inhibitorio de manera continua sobre la ciclasa. Sin embargo no es lo que ocurre, parece ser que la acción de la toxina sobre α i la modifica de tal forma que no puede interaccionar con la ciclasa, por lo tanto al no haber una restricción sobre la adenilato ciclasa, esta queda activada permanentemente (9,80).

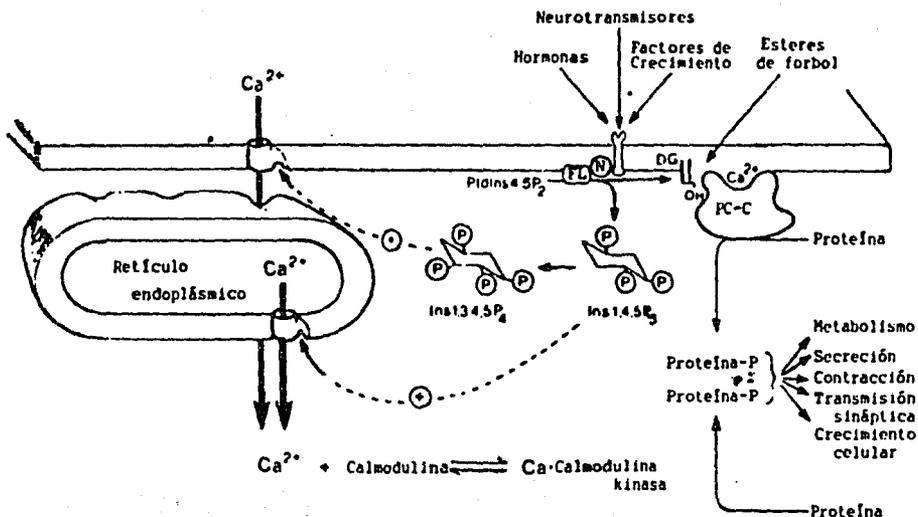
SISTEMA FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.

Ciertas hormonas, así como otras sustancias biologicamente activas, tienen receptores que provocan la hidrólisis de fosfolípidos de inositol y aumento del calcio intracelular, como mecanismo para transducir señales extracelulares hacia la célula, ejemplos de tales hormonas son la epinefrina, la acetilcolina, la vasopresina, la angiotensina II y la histamina, entre

otras (10).

Hokin y Hokin fueron los primeros en reconocer la respuesta de los fosfolípidos de inositol a la estimulación de receptores de superficie celular, al observar que la acetilcolina induce incorporación de fósforo 32 al fosfatidil inositol (IP) y al ácido fosfatídico. En la década de 1970, Michell y otros investigadores sugirieron la existencia de un nuevo mecanismo de transducción acoplado a los receptores, que implica el recambio de fosfoinosítidos. Posteriormente Berridge y colaboradores demostraron que la hidrólisis de fosfoinosítidos es un requisito para la movilización de calcio de almacenes intracelulares.

Ahora se sabe que ciertos agonistas al ocupar a su receptor, activan una proteína de membrana, llamada fosfodiesterasa o fosfolipasa C (FLC), que hidroliza un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) a mio-inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG), los cuales funcionan como segundos mensajeros intracelulares. La activación de la FLC por el receptor esta mediada por una proteína reguladora fijadora de nucleótidos, denominada Gp. Algunos estudios en que se ha utilizado toxina pertussis (72) y otros en los que se estimula a la FLC con análogos del GTP (71), sugieren la existencia de esta proteína Gp. (Ver esquema 3).



Esquema 3. Modelo sobre el mecanismo de acción de los mensajeros del sistema fosfoinosítidos-calcio. N, proteína G acopladora; FL, fosfolipasa C; DG, -diacilglicerol; PtdIns 4,5 P₂, fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; PC-C, proteína cinasa C; Ins 1,4,5 P₃, inositol trifosfato.

El PIP2 es un fosfolípido menor, formado en la membrana plasmática a partir de fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP). El PIP2 y el PIP pueden ser reconvertidos a PI. En algunos tipos celulares existe otra vía principal del metabolismo de fosfoinosítidos donde son hidrolizados por la fosfolipasa A2 para producir a el lisofosfolípido y a el ácido araquidónico, (él cual después es convertido a una variedad de eicosanoides bioactivos) (11-14).

El inositol trifosfato (IP3), uno de los productos de la hidrólisis del PIP2, funciona en la célula como segundo mensajero, se ha postulado que actúa moviendo el calcio intracelular de almacenes localizados principalmente en el retículo endoplásmico (15). Se piensa que exista un receptor en el retículo endoplásmico para el IP3, a través del cual se estimula la salida de calcio (16). El aumento de calcio intracelular es rápidamente disminuido por su captura a través de la mitocondria y su expulsión fuera de la célula por la ATPasa de calcio.

El inositol trifosfato es rápidamente recambiado, puede ser fosforilado por una cinasa formando inositol-1,3,4,5-tetrafosfato (IP4), el cual parece tener un importante papel en la regulación de la entrada de calcio extracelular, de tal manera que se regulen los niveles de calcio modificados por la acción del IP3 (73). Por otro lado el IP3 puede también ser degradado por fosfatasa a mioinositol 1,4-bifosfato (IP2), mioinositol 1-fosfato

(IP) y mioinositol (12).

El calcio liberado por la acción del IP₃, puede unirse a proteínas o enzimas citoplásmicas, entre las que se encuentra la calmodulina. El complejo calcio-calmodulina es responsable de la activación de una serie de proteínas cinasas que intervienen en la regulación de algunas funciones celulares (10).

El otro producto de la hidrólisis del PIP₂ es el diacilglicerol, que se propuso como segundo mensajero al encontrar Nishizuka y su grupo, que activa a una proteína cinasa dependiente de fosfolípidos-Ca⁺⁺ (PKC), la cual tiene una amplia distribución en diversos tejidos (17).

El diacilglicerol es hidrofóbico y se produce principalmente en la membrana plasmática donde puede ser metabolizado en ácido fosfatídico o a 1-acilglicerol y ácido araquidónico. El diacilglicerol tiene como función activar a la PKC mediante un proceso que requiere calcio y fosfolípidos, particularmente fosfatidilserina, como cofactores. El diacilglicerol (DAG) aumenta la afinidad de la enzima por el calcio de tal forma que se puede activar sin cambio en los niveles de calcio (18).

La PKC puede también ser irreversiblemente activada vía proteólisis por la calpaína, esta forma de la proteína es activa en ausencia de calcio, fosfolípidos o DAG, pero su importancia fisiológica no se conoce (18,19).

Los efectos fisiológicos de la proteína cinasa C incluyen la fosforilación de proteínas específicas que probablemente están implicadas en algunas respuestas fisiológicas (21).

Los ésteres del forbol, sustancias diterpénicas promotoras de tumores, poseen una estructura química similar a la del DAG, lo que sugiere que de esta forma mimeticen su acción al activar a la PKC (20). Los ésteres de forbol constituyen un arma que se utiliza en el estudio de las acciones de la PKC.

Entre las acciones mediadas por los segundos mensajeros IP₃ y DAG, parece existir un sinergismo, esto se ha observado utilizando en conjunto un ionóforo, que mimetiza las acciones del IP₃, y los ésteres del forbol, que mimetizan las acciones del DAG, de manera que se obtiene un efecto máximo de la respuesta celular. Si bien ambos mensajeros pueden actuar separadamente para producir respuestas fisiológicas, a menudo lo hacen sinérgicamente (10,18).

HORMONAS ESTUDIADAS

a) GLUCAGON

El glucagon es una hormona polipeptídica que contiene 29 aminoácidos, y con un peso molecular de 3500 Da; es secretado a la sangre por las células alfa de los islotes pancreáticos de Langerhans, cuando los niveles de glucosa

en sangre se encuentran por debajo de los normales (22). El glucagon actúa principalmente en el hígado donde aumenta la glucogenólisis y la gluconeogénesis, para restaurar los niveles de glucosa en sangre, además de incrementar la ureogénesis (34); en tanto que en tejido adiposo aumenta la lipólisis (23).

Esta hormona fue descubierta en 1923 por Murlin y colaboradores. A la fecha se sabe que actúa sobre receptores de la membrana plasmática acoplados estimulatoriamente a la adenilato ciclasa, es decir su acción incrementa los niveles de AMP cíclico. Algunos reportes sugieren que el AMPc no es el único factor implicado en las acciones del glucagon (24,25). Recientemente se ha reportado la activación de dos sistemas de transducción por el glucagon. Además del de la adenilato ciclasa, se piensa que existe un segundo receptor del glucagon acoplado al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, que es estimulado a bajas concentraciones del péptido (26,27). Sin embargo, son necesarios más estudios para aclarar la acción del glucagon.

b) EPINEFRINA

La epinefrina es una hormona del grupo de las catecolaminas, sintetizada a partir del aminoácido tirosina en las células cromafines de la médula de las glándulas suprarrenales y en los nervios simpáticos. Esta

molécula puede funcionar tanto como neurotransmisor o como hormona y actúa sobre una gran variedad de tejidos. Es secretada generalmente en situaciones de agobio o miedo, desencadenando una serie de reacciones que constituyen una respuesta de "lucha o huida" (28).

La epinefrina ejerce su efecto a través de receptores localizados en la membrana plasmática. Estos receptores se han dividido con base en diferencias farmacológicas en alfa y beta (29). Los receptores alfa se subdividen en alfa 1 y alfa 2, los primeros se encuentran asociados a la movilización de calcio y recambio de fosfoinosítidos, mientras que los alfa 2 están acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa (30,31). Así mismo, los receptores beta han sido subdivididos en beta 1 y beta 2, ambos acoplados estimulatoriamente a la adenilato ciclasa, poseen una diferente afinidad por varios agonistas y antagonistas y además tienen una distinta localización (32). Ariens y colaboradores sugirieron que los efectos beta 1 son debidos a la norepinefrina liberada por los nervios simpáticos, mientras que los beta 2 son debidos a la epinefrina liberada por la médula suprarrenal (33).

Se ha encontrado que en el hígado la epinefrina estimula la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis (34). Se ha reportado que se presentan tres tipos de receptores adrenérgicos en el hígado, beta 2, alfa 1 y alfa 2, siendo la mayoría de ellos del tipo alfa 1 (29). Existe evidencia de que bajo ciertas condiciones

se puede dar una aparente conversión de la respuesta adrenérgica en el hígado (35). En las ratas adultas, por ejemplo, la regulación adrenérgica es principalmente mediada por el receptor alfa 1, pero esta misma regulación es mediada por los receptores beta en ratas fetales o en ratas adultas bajo ciertas condiciones como deficiencias en glucocorticoides y hormonas tiroideas, o regeneración del hígado (36), entre otras. El estado hipotiroideo en ratas adultas incrementa la respuesta beta-adrenérgica debido a que induce un aumento en el número de receptores de este tipo, por lo que este modelo es uno de los más útiles para estudiar la respuesta beta-adrenérgica hepática (37).

DESENSIBILIZACION DE LA RESPUESTA CELULAR

La respuesta celular a una hormona o a cualquier agente estimulador está regulada por diferentes mecanismos. Uno de estos mecanismos de regulación es el fenómeno de desensibilización, también llamado taquifilaxia o tolerancia. Este fenómeno se manifiesta luego de que las células han estado expuestas, repetidas veces o por un tiempo prolongado, a un estímulo externo, y se observa como una disminución en la respuesta celular a dicho estímulo. Hasta ahora se han descrito dos tipos de desensibilización: la desensibilización homóloga o específica, que se refiere a la que se presenta cuando una

célula es expuesta a un agente y luego cuando se expone de nuevo al mismo agente su respuesta se ve disminuida, sin alterarse la respuesta celular a otros agentes estimuladores; y la desensibilización heteróloga, en la cual la célula luego de la exposición a un agente estimulador, disminuye su respuesta a otros agentes no relacionados con el de la exposición inicial (38-41).

Los mecanismos bioquímicos o moleculares por los cuales se presenta la desensibilización son muy diversos y difieren de un sistema de transducción a otro, incluso de un tipo celular a otro.

En general, los sistemas de transducción constan de tres partes: receptor, transductor y efector, una modificación en cualquiera de ellos puede llevar a un cambio en la eficiencia del sistema. Se han propuesto diversas alteraciones que estos componentes pueden tener y que llevarían a una disminución en la respuesta celular, tales como: pérdida de los receptores por internalización y probablemente subsecuente degradación (74,75), cambios estructurales del receptor que disminuyan su afinidad por las hormonas o su acoplamiento con las proteínas G, alteraciones en las proteínas G o en las enzimas efectoras (adenilato ciclasa o fosfolipasa C) disminuyendo su actividad catalítica o desacoplándolas del receptor, ó un aumento de la actividad de la fosfodiesterasa en el sistema de la adenilato ciclasa que disminuyera los niveles de AMPc, además se ha propuesto la producción o

activación de sustancias inhibitorias que puedan afectar los componentes del sistema (40).

La desensibilización homóloga, según varios estudios (41-46), más bien implica alteraciones a nivel del receptor, se propone que éstas incluyen cambios conformacionales, modificaciones covalentes como la fosforilación (44,45,76), internalización y degradación del receptor (41), cualquiera de estos cambios explicaría por qué en este tipo de desensibilización generalmente se observa una disminución en la unión hormona-receptor (40).

En cambio en los estudios sobre desensibilización heteróloga (47-51, 58), el mecanismo parece ser más general, la desensibilización parece resultar de la activación o producción de sustancias inhibitorias, siendo los sitios de acción más probables algunos componentes del sistema de transducción distantes del receptor, tales como las proteínas G o las enzimas efectoras (40).

Quizás la naturaleza heteróloga del efecto hace poco probable que ocurra una modificación en el receptor (39), sin embargo el receptor en ocasiones también resulta alterado (40).

La fosforilación de proteínas mediada por cinasas celulares específicas se considera como un importante mecanismo intracelular de control. Dos importantes proteínas están implicadas en los fenómenos de desensibilización, activadas cada una por la estimulación

de su propio sistema de transducción, la PKA y la PKC. Estas proteínas tienen un importante papel en la fosforilación de varias proteínas celulares, entre las que se encuentran los componentes tanto de su propio sistema de transducción como los componentes de otro sistema, ya que estas cinasas comparten algunos sustratos, a cuyos residuos de serina y treonina fosforilan, se ha propuesto que existe una posible interacción entre los dos sistemas de transducción (59,60). Así parece ser que la PKA y la PKC pueden tener un importante papel en la modulación de la transducción de la señal hormonal, sirviendo como un mecanismo de regulación negativa de su propio sistema o de otro sistema (60). (Ver esquema 4).

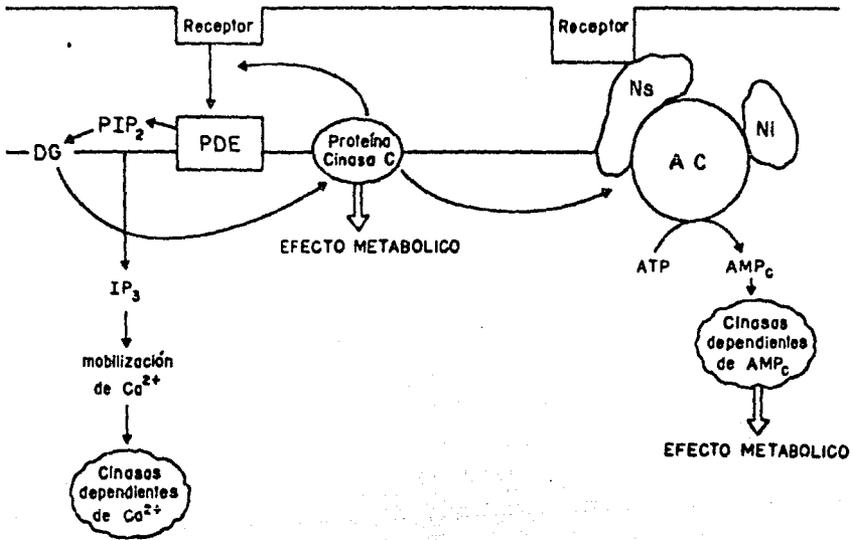
Recientemente se ha reportado la existencia de una proteína cinasa independiente de AMPc, denominada proteína cinasa del receptor beta adrenérgico (PK-RBA), que parece fosforilar al receptor sólo cuando se encuentra ocupado por el agonista (61,62), parece ser que participa en fenómenos de desensibilización homóloga, donde la fosforilación del receptor no está dada por la PKA (50,60,61).

Sin embargo la PKC ha recibido gran atención en los estudios de desensibilización, y ya que se ha encontrado que bloquea varios sitios de la transducción de la señal hormonal, se han desarrollado herramientas que permitan distinguir estos posibles sitios de acción, una de estas armas son los ésteres de forbol que pueden activar a la

de su propio sistema de transducción, la PKA y la PKC. Estas proteínas tienen un importante papel en la fosforilación de varias proteínas celulares, entre las que se encuentran los componentes tanto de su propio sistema de transducción como los componentes de otro sistema, ya que estas cinasas comparten algunos sustratos, a cuyos residuos de serina y treonina fosforilan, se ha propuesto que existe una posible interacción entre los dos sistemas de transducción (59,60). Así parece ser que la PKA y la PKC pueden tener un importante papel en la modulación de la transducción de la señal hormonal, sirviendo como un mecanismo de regulación negativa de su propio sistema o de otro sistema (60). (Ver esquema 4).

Recientemente se ha reportado la existencia de una proteína cinasa independiente de AMPc, denominada proteína cinasa del receptor beta adrenérgico (PK-RBA), que parece fosforilar al receptor sólo cuando se encuentra ocupado por el agonista (61,62), parece ser que participa en fenómenos de desensibilización homóloga, donde la fosforilación del receptor no está dada por la PKA (50,60,61).

Sin embargo la PKC ha recibido gran atención en los estudios de desensibilización, y ya que se ha encontrado que bloquea varios sitios de la transducción de la señal hormonal, se han desarrollado herramientas que permitan distinguir estos posibles sitios de acción, una de estas armas son los ésteres de forbol que pueden activar a la



Esquema 4 Modelo del papel de la proteína Cinasa C sobre el sistema de transducción de la adenilato ciclasa y del sistema fosfoinosítidos-calcio.

PKC, mimetizando la acción del diacilglicerol, en ausencia de recambio de fosfoinosítidos. La activación de la proteína cinasa C por los ésteres de forbol ha mostrado en algunos sistemas una disminución en la respuesta celular (47-50) mientras que en otros ocurre lo contrario, esta activación lleva a un aumento de la respuesta celular (59).

Así parece ser que la desensibilización de la respuesta celular es un mecanismo que permite mantener un equilibrio en el medio interno de las células. Si bien puede estar implicada en la regulación de la respuesta celular a cambios hormonales resultantes de influencias ambientales, parece también estar relacionada con estados patológicos asociados con alteraciones en el medio hormonal, que pueden llevar a una desensibilización de los receptores a la acción hormonal (41).

En resumen puede decirse que la desensibilización resulta ser un importante mecanismo protector empleado por las células para preservar su equilibrio dinámico.

OBJETIVOS

El presente trabajo, sobre el estudio de la desensibilización de la respuesta celular, tiene como objetivos:

- Aportar evidencias sobre una posible comunicación o interrelación entre los dos principales mecanismos de transducción de la señal hormonal.
- Estudiar como la activación de la proteína cinasa C, por los esteroides de forbol, modula la respuesta celular a hormonas acopladas al sistema de la adenilato ciclasa.
- Investigar los posibles sitios afectados por el PMA durante la desensibilización heteróloga y caracterizar el fenómeno.
- Estudiar si la desensibilización heteróloga inducida por el PMA y la homóloga inducida por la isoprenalina se realizan a través del mismo mecanismo.
- Estudiar el efecto de la toxina pertussis sobre las desensibilizaciones homóloga y heteróloga.

MATERIALES Y METODOS

1) Sustancias utilizadas:

La isoprenalina, el 3-isobutil-metil-xantina (MIX), L- glutamina, L-ornitina, 6-n propil-2-tiouracilo (PTU), ureasa, guanosintrifosfato (GTP), guanilil-imidodifosfato (GppNHp), teofilina, adenosintrifosfato (ATP), fosfocreatina, creatina cinasa, dibutiril adenosin-monofosfato cíclico, y el 4 beta-forbol, 12 beta miristato-13 alfa acetato (PMA) fueron de Sigma Chemical Co. El glucagon fue donado de Eli Lilly, el percoll fue de Pharmacia, la colagenasa fue de Worthington, la forskolina fue obtenida de Calbiochemical, el AMPc (H3) y el (α -32 P) ATP son de New England Nuclear.

La toxina pertussis fue purificada por el método de Sekura, et al (63), a partir de un concentrado de vacuna.

2) Animales

Se utilizaron ratas hembra Wistar, hipotiroideas, de 200 a 250 gr, alimentadas "ad libitum". El hipotiroidismo se indujo en los animales al administrar en el agua de beber 6-n-propil-tiouracilo (PTU) al 0.03 % por un período de 40 a 50 días previos al experimento. Esta sustancia causa una disminución en los niveles de hormonas tiroideas (41). Las ratas hipotiroideas presentan una hipertrofia de

la tiroides, resequedad del pelaje y disminución en el peso, así como alteraciones funcionales del hígado, entre las que pueden citarse un aumento notable en la respuesta beta adrenérgica, razón por la cual fueron empleadas como modelo experimental.

Además se utilizaron animales hipotiroideos tratados con toxina pertussis, la cual se administró, inyectando intraperitonealmente 25 microgramos/ 100 gr de peso, 3 días antes del experimento.

3) Aislamiento de hepatocitos.

Las células se aislaron por el método de Berry y Friend (64) modificado por Tolbert, et al (65). Los animales se anestesiaron con cloroformo, se abrió la cavidad abdominal, se canuló la vena porta hepática y se perfundió con una solución amortiguadora Krebs-Ringer-bicarbonato sin calcio saturada con oxígeno/dióxido de carbono (95% / 5%) a un pH de 7.4 y a 37 °C. El hígado fue aislado y perfundido con la misma solución suplementada con calcio y colagenasa para digerir parcialmente el tejido hepático. Las células se dispersaron en la solución amortiguadora y se lavaron tres veces. Se obtuvo finalmente una concentración de 30-40 mg de células/ ml. La viabilidad se estimó por exclusión con azul de tripano al 0.1% y fué de 80-95%.

4) Aislamiento de membranas.

Las membranas fueron aisladas de hepatocitos frescos por una modificación del método de Loten y Redshaw-Loten (66). Las células se homogenizaron a 4 °C en 12.5 ml de una solución amortiguadora Tris-sacarosa (250 mM sacarosa, 10 mM Tris pH 7.5). El homogenizado se centrifugó y luego se adicionaron 12.5 ml de la misma solución amortiguadora Tris-sacarosa, mas 3.4 ml de percoll y 0.5 ml de sacarosa 2 M, se volvió a homogenizar y centrifugar. Las membranas fueron extraídas de la superficie del gradiente formado por el percoll, se lavaron con una solución amortiguadora Tris-Cloruro de Magnesio (5 mM Cloruro de magnesio, 25 mM Tris pH 7.5) y finalmente se resuspendieron en la misma solución Tris Cloruro de magnesio y se congelaron en nitrógeno líquido.

5) Incubación con las hormonas.

La respuesta celular se valoró tomando como parámetros la ureogénesis y la acumulación de AMPc, en células intactas, y la actividad de la adenilato ciclasa en membranas aisladas.

Una vez aisladas las células se preincubaron 15 min, (o por diferentes tiempos según se especifique) a 37 °C con el forbol miristato acetato (PMA) a una concentración de 0.1 μ M (o a las concentraciones que se indiquen), luego se lavaron las células 3 veces con solución

amortiguadora para eliminar el agente del medio, y en seguida se incubaron con las hormonas y los diferentes agentes.

a) Determinación de la Ureogénesis.

Las células se incubaron a 37 °C por una hora con las hormonas, en solución amortiguadora suplementada con ornitina 2mM y glutamina 10 mM. La producción de urea se determinó, en el sobrenadante, por el método de Cutman y Bergmeyer (67).

b) Cuantificación de la acumulación de AMPc.

Los hepatocitos se incubaron a 37 °C con las hormonas durante 2 minutos, en presencia de MIX 0.1 mM un inhibidor de la fosfodiesterasa.

El AMPc se determinó por el método de Gilman (68), modificado por Brown, et al (84), que se basa en la competencia de unión, entre el AMPc marcado con tritio y el AMPc no marcado, a una proteína dependiente de AMPc. El AMPc no pegado se quitó del medio con carbón activado y luego se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Los valores obtenidos se compararon con una curva patrón y se estimó la cantidad de AMPc acumulado.

c) Actividad de la Adenilato Ciclasa.

La actividad de la adenilato ciclasa se determinó en membranas aisladas de hepatocitos frescos, por el método de Salomon, et al (69).

La reacción fué llevada a cabo en una mezcla que contenía además de las hormonas y otros agentes, GTP, Gpp(NH)p y forskollina, 25 mM de Tris pH 7.5, 0.4 mM de ATP (conteniendo 1 a 2 millones de cpm de (alfa 32 P - ATP), 5 mM de cloruro de magnesio, 10 mM de teofilina, 7.4 mg / ml de fosfocreatina y 1 mg / ml de creatina cinasa, a la cual se adicionaron las membranas (aproximadamente 150 microgramos de protefna) con un volumen final de 100 microlitros, se incubaron por 20 minutos a 30 °C. Se adicionó una cantidad conocida de AMPc (H3) para medir la eficiencia de recuperación de AMPc en la cromatografía. El AMPc (32P) producido fue aislado por cromatografía de intercambio iónico en columnas de alúmina y dowex. La radioactividad fue cuantificada en un contador de centelleo líquido.

La cantidad de protefna fue determinada por el método de Lowry, et al (70), se utilizó albúmina de suero de bovino como patrón.

6) Análisis Estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar de determinaciones por triplicado de 5 a 8 experimentos. Se utilizó la prueba t de Student para determinar el grado de significancia entre los diferentes grupos de datos.

RESULTADOS

La epinefrina y el glucagon son dos de las principales hormonas reguladoras del metabolismo hepático. En los hepatocitos de ratas hipotiroideas los receptores a glucagon y los beta-adrenérgicos se encuentran acoplados a la adenilato ciclasa de manera estimuladora, por lo tanto su acción aumenta los niveles de AMPc; además estimulan entre las varias funciones hepáticas la ureogénesis. En las figuras 1 y 2 se observan las curvas dosis respuesta a isoprenalina (agonista B-adrenérgico) y a glucagon, sobre la acumulación de AMPc y la ureogénesis en células preincubadas 15 minutos sin ningún agente (controles) y con PMA. Se observa que el PMA disminuye la respuesta celular a la acción de las hormonas en ambos parámetros. Disminuye un 30 a 50 % la estimulación de la ureogénesis y un 20 a 30 % la acumulación de AMPc estimuladas por glucagon e isoprenalina mostrando así una desensibilización del tipo heterólogo del sistema de la adenilato ciclasa.

Al observar la acción producida por el PMA, decidimos caracterizar el fenómeno. En la figura 3 se muestra la curva dosis respuesta a PMA. Las células se preincubaron con dosis crecientes de PMA y después de lavarse para eliminar este agente del medio, se estimularon con dosis máximas de las hormonas. Observamos que el PMA provoca una disminución de la respuesta celular a las acciones de glucagon e isoprenalina de una manera dependiente de la

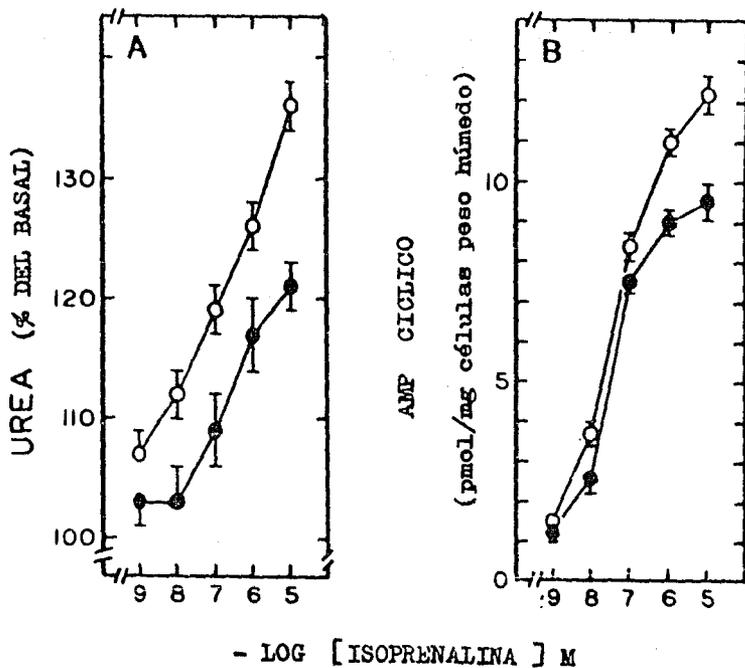


Fig 1. Efecto del PMA sobre la ureogénesis y la acumulación de AMP cíclico, estimuladas por isoprenalina.

Los hepatocitos se preincubaron 15 min en ausencia 0 o presencia ● de $0.1 \mu\text{M}$ PMA. Después de lavarse las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de isoprenalina.

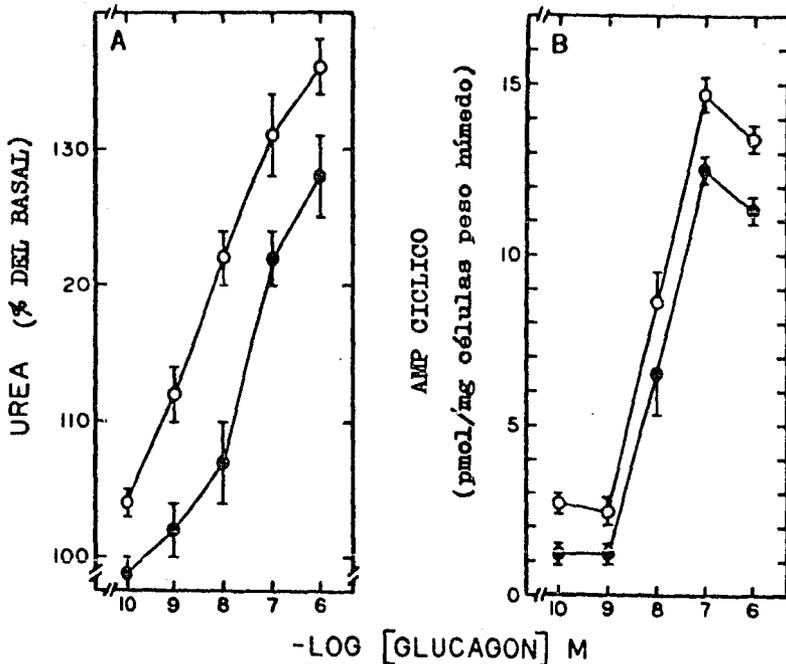


Fig 2. Efecto del PMA sobre la acción del glucagon en la ureogénesis y en la acumulación de AMP cíclico. Los hepatocitos se preincubaron 15 min en la ausencia 0 o presencia ● de 0.1 μM de PMA. Las células se lavaron y después se incubaron con diferentes concentraciones de glucagon.

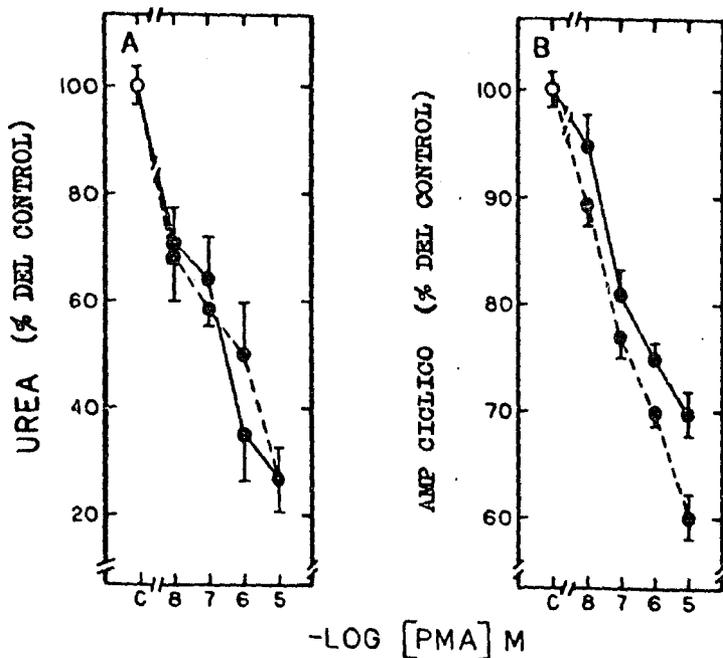


Fig 3. Las desensibilizaciones B-adrenérgica y al glucagon como función de la concentración de PMA. Las células se preincubaron por 15 min con las concentraciones de PMA indicadas. Posteriormente se lavaron y entonces se incubaron con isoprenalina $10 \mu\text{M}$ (—) o con glucagon $0.1 \mu\text{M}$ (---). Los datos son presentados como porcentaje del control.

dosis. El efecto del PMA sobre las acciones de glucagon e isoprenalina es muy similar y ocasiona una desensibilización de un 70 a 80 % en la ureogénesis y de un 30 a 40 % en la acumulación de AMPc.

En la figura 4, se muestra el curso temporal de la desensibilización inducida por el PMA sobre la respuesta celular a glucagon e isoprenalina. Al tomar como parámetro la acumulación de AMPc se observa que la máxima desensibilización ocurre a los 30 minutos con una desensibilización máxima cercana al 30% y una inhibición promedio del 15% a los 15 minutos, en cambio en la ureogénesis la desensibilización es mayor aproximadamente de un 70% y se presenta desde los 2 minutos de preincubación con el PMA. Las diferencias observadas tanto en el curso temporal como en las curvas dosis respuesta a PMA pueden explicarse debido a las diferentes condiciones que se emplean para cuantificar dichos parámetros. Para medir el AMPc, las células sólo se incuban con las hormonas por 2 minutos, mientras que para determinar la ureogénesis se requiere que las células se incuben una hora con las hormonas; de tal manera que el AMPc es un parámetro que nos refleja de forma más fehaciente el momento en que puede ocurrir la desensibilización.

Hasta aquí nuestros resultados muestran que el PMA disminuye la respuesta celular a hormonas acopladas a la adenilato ciclasa y esto lo hace de manera dependiente del tiempo y de la dosis. Lo siguiente consistió en examinar a que nivel ocurría este fenómeno de desensibilización y

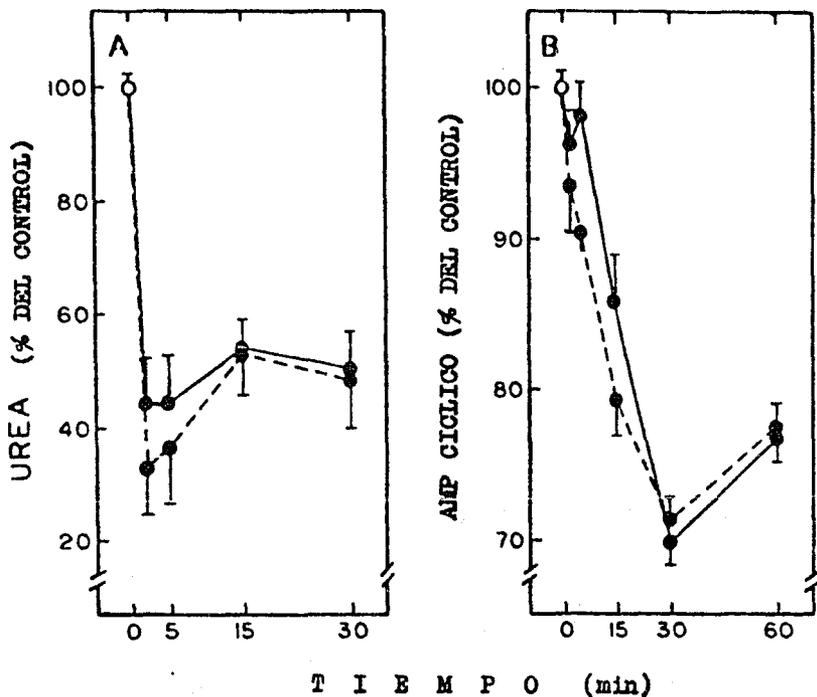


Fig 4. Curso temporal de la desensibilización inducida por PMA sobre la ureogénesis y la acumulación de AMP cíclico, estimuladas por glucagon e isoprenalina. Las células se preincubaron por diferentes tiempos, como se indican, con PMA $0.1 \mu\text{M}$. Después se lavaron y se incubaron con glucagon $0.1 \mu\text{M}$ (---) o isoprenalina $10 \mu\text{M}$. (—). Los resultados se muestran como porcentaje del control.

para ello empleamos membranas aisladas de hepatocitos preincubados sin PMA (controles) y con PMA. Se estimuló con dosis máximas de las hormonas (isoprenalina $10 \mu\text{M}$ y glucagon $1 \mu\text{M}$) más GTP ($100 \mu\text{M}$), con Gpp(NH)p ($100 \mu\text{M}$) un análogo no hidrolizable del GTP o con forskolina ($100 \mu\text{M}$) que activa directamente a la ciclasa. En la tabla I se muestra que la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de células controles es estimulada 2 veces por isoprenalina, 7 veces por glucagon, 3 veces por Gpp(NH)p y 8 veces por forskolina. El PMA disminuye en aproximadamente 20 % la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por las hormonas pero no afecta la respuesta a forskolina ni el basal. La respuesta a Gpp(NH)p el análogo del GTP, que actúa sobre las proteínas G, se ve disminuida en un 30%. Estos datos nos sugieren que probablemente la desensibilización heteróloga inducida por el PMA sea a nivel de la proteína regulatoria Gs.

En nuestro laboratorio se demostró previamente que la isoprenalina induce una desensibilización homóloga de la respuesta celular (46) pensamos entonces en ver si la desensibilización dada por el PMA y la inducida por la isoprenalina ocurrían o no por la misma vía. Al emplear hepatocitos intactos en los que se midió la acumulación de AMPc y membranas aisladas, donde se determinó la actividad de la adenilato ciclasa, se estudiaron las desensibilizaciones homóloga y heteróloga. En la tabla I se muestra la actividad de la adenilato ciclasa en membranas. Las células se preincubaron con isoprenalina,

con PMA o con ambos agentes, luego se aislaron las membranas y se estimuló con las hormonas más GTP, con Gpp(NH)p o con forskolina. En la tabla I observamos que la preincubación con isoprenalina sólo disminuye en aproximadamente un 30% la respuesta a la estimulación con isoprenalina y no a los otros agentes, se confirma así que la desensibilización es de tipo homólogo. El PMA disminuye la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por las hormonas en alrededor de un 20% y en un 30% a Gpp(NH)p pero no afecta la respuesta a forskolina, se observa así la desensibilización heteróloga. Para inducir simultáneamente las desensibilizaciones homóloga y heteróloga se preincubaron a las células con los dos agentes, PMA más isoprenalina. Los resultados muestran que la respuesta a forskolina no se altera; la respuesta a glucagon y a Gpp(NH)p disminuye en un 25% y 20% respectivamente, siendo estos valores muy similares a los obtenidos con una preincubación con PMA solamente; por otro lado la respuesta a isoprenalina disminuye en un 45% aproximadamente lo que indicaría que las desensibilizaciones inducidas por isoprenalina y por PMA son aditivas. En la tabla II se muestran resultados muy similares y esta misma aditividad, pero en células intactas.

Algunos reportes muestran que la desensibilización del tipo heterólogo puede ser evitada o bloqueada por la toxina pertussis (51,81), mientras que en otros no se observa efecto alguno (46,82). Nosotros empleamos células de ratas tratadas con la toxina y estudiamos el fenómeno

TABLA I. DESENSIBILIZACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA EN MEMBRANAS DE HEPATOCITOS TRATADOS CON PMA, ISOPRENALINA, O PMA MAS ISOPRENALINA. Los hepatocitos se preincubaron con o sin los ligandos; se prepararon las membranas y se midió la actividad de la adenilato ciclasa.

Agentes	Control actividad específica (pmol/min por mg de proteína).	Pretratamiento de las células		
		PMA 0.1 μ M	ISOPRENALINA 100 μ M	ISOPRENALINA 100 μ M + PMA 0.1 μ M
(% de la estimulación observada en membranas control)				
BASAL	7.5 \pm 0.67	124 \pm 2	114 \pm 1	93 \pm 2
ISOPRENALINA 10 μ M + 100 μ M GTP	16.9 \pm 1.0 (2.3 = veces)	82 \pm 6 ^a	69 \pm 5 ^b	56 \pm 2 ^{c,d,e}
GLUCAGON 1 μ M + 100 μ M GTP	53.9 \pm 4.6 (7.2 = veces)	82 \pm 4 ^a	90 \pm 4	75 \pm 4 ^a
Gpp(NH)p 100 μ M	22.0 \pm 2.0 (2.9 = veces)	69 \pm 4 ^b	99 \pm 6	79 \pm 5 ^a
FORSKOLINA 100 μ M	63.8 \pm 4.0 (8.5 = veces)	95 \pm 4	112 \pm 10	100 \pm 8

^a_p < 0.05 vs control

^b_p < 0.005 vs control

^c_p < 0.001 vs control

^d_p < 0.001 vs pretratamiento con PMA

^e_p < 0.025 vs pretratamiento con isoprenalina.

TABLA II. DESENSIBILIZACION DE LA ADENILATO CICLASA EN HEPATOCITOS TRATADOS CON PMA, ISOPRENALINA o PMA MAS ISOPRENALINA. Los hepatocitos fueron preincubados por 15 min con o sin los ligandos. Las células se lavaron y se incubaron por 2 min con MIX 100 μ M y los diferentes agentes mostrados.

Agentes	pmol AMPc/mg de células	Acumulación de AMP cíclico		
		Pre-tratamiento de las células		
		PMA 0.1 μ M	ISOPRENALINA 100 μ M	ISOPRENALINA 100 μ M + PMA 0.1 μ M
		(% de la acumulación observada en células controles)		
BASAL	0.52 \pm 0.05	108 \pm 24	138 \pm 13	127 \pm 19
ISOPRENALINA 10 μ M	9.66 \pm 0.23	86 \pm 2 ^a	69 \pm 2 ^a	57 \pm 3 ^{a,b,c}
GLUCAGON 100 nM	10.95 \pm 0.38	81 \pm 2 ^a	99 \pm 2	81 \pm 2 ^a

^a_p < 0.001 vs control

^b_p < 0.001 vs pretratamiento con PMA.

^c_p < 0.01 vs pretratamiento con Isoprenalina.

de desensibilización; en la tabla III se presentan los datos, las células se preincubaron 15 min con PMA ($0.1 \mu\text{M}$) con isoprenalina ($100 \mu\text{M}$) y luego de lavarse para eliminar estos agentes del medio, se determinó la acumulación de AMPc en células intactas y la actividad de la adenilato ciclasa en membranas, los resultados señalan que la toxina pertussis bloquea la desensibilización heteróloga inducida por el PMA, pero no afecta la de tipo homólogo inducida por la isoprenalina; esto último confirma los datos previamente encontrados en nuestro laboratorio (65).

TABLA III.- EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LAS DESENSIBILIZACIONES HOMOLOGA Y HETEROLOGA. Los hepatocitos se aislaron de ratas tratadas con toxina pertussis. Las células se preincubaron con o sin los ligandos y luego de lavarse se incubaron con los diferentes agentes.

		ACUMULACION DE AMPc	
		Pretratamiento de las células	
		PMA 0.1 μ M	ISOPRENALINA 100 μ M
		(% de la estimulación observada en el control)	
Agentes	pmol AMPc/mg de células		
BASAL	0.7 \pm 0.1	164 \pm 28	242 \pm 28 ^a
ISOPRENALINA 10 μ M	10.6 \pm 0.3	91 \pm 3	58 \pm 2 ^a
GLUCAGON 100 nM	13.1 \pm 0.3	98 \pm 3	94 \pm 2
FORSKOLINA 100 μ M	17.5 \pm 0.4	107 \pm 3	91 \pm 2
ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA			
Agentes	Control Actividad específica (pmol/min por mg de proteína).		
BASAL	6.0 \pm 0.53	98 \pm 11	107 \pm 7
ISOPRENALINA 10 μ M + 100 μ M GTP	15.9 \pm 0.66 (2.7 veces)	94 \pm 6	77 \pm 5a
GLUCAGON 1 μ M + 100 μ M	50.5 \pm 4 (8.4 veces)	90 \pm 5	92 \pm 4
Gpp(NH)p 100 μ M	18.7 \pm 0.78 (3.1 veces)	99 \pm 6	91 \pm 2
FORSKOLINA 100 μ M	66.7 \pm 6 (11 veces)	99 \pm 3	101 \pm 4

^ap < 0.001

La gran diversidad de agentes que activan el metabolismo celular a través de los sistemas de transducción de la señal hormonal y la similitud entre los componentes de estos sistemas, han llevado a pensar en una posible interacción entre el sistema de la adenilato ciclasa y el de los fosfoinosítidos-calcio. Varios estudios han mostrado esta posible intercomunicación (59,60). En nuestro laboratorio se inició una investigación sobre los efectos de la proteína cinasa C (PKC) sobre el sistema de la adenilato ciclasa. En hepatocitos aislados de ratas hipotiroideas estudiamos como la activación, farmacológica (ésteres de forbol) o fisiológica (vasopresina), de la PKC modula la respuesta a hormonas acopladas estimulatoriamente a la adenilato ciclasa. Encontramos que estos agentes activadores de la PKC inhiben la acumulación de AMP cíclico y la ureogénesis estimuladas por glucagon e isoprenalina. Además si adicionabamos un inhibidor de la PKC como el H7 (derivado de sulfonamidas), el bloqueo era revertido. Estos resultados sugieren que la PKC puede funcionar como un modulador del sistema de la adenilato ciclasa, y muestran evidencia de una interacción entre los sistemas fosfoinosítidos-calcio y adenilato ciclasa (77).

Como continuación a dicho trabajo se inició un estudio para ver si la activación de la PKC, por los

ésteres de forbol, era capaz de provocar una desensibilización de la respuesta celular a hormonas asociadas al sistema de la adenilato ciclasa.

Nuestros resultados muestran que el PMA, agente activador de la PKC, disminuye significativamente la acumulación de AMPc así como la ureogénesis estimuladas por glucagon e isoprenalina, de manera muy similar. Esto indica una desensibilización de tipo heterólogo inducida por el PMA sobre el sistema de la adenilato ciclasa. Heyworth, et al (54 y 55) y Murphy, et al (57), reportan también una desensibilización de la adenilato ciclasa en hepatocitos provocada por el PMA, otros autores han observado este mismo fenómeno pero en otros sistemas como leucocitos (40), miocitos (60), eritrocitos (47) y células de la línea MDCK de riñon (53).

Se procedió a caracterizar el fenómeno, para lo cual se obtuvieron las curvas dosis respuesta a PMA y el curso temporal, estos resultados muestran que el PMA provoca una inhibición de las respuestas a glucagon y a isoprenalina de manera muy similar; dependiente del tiempo y de la dosis (figs. 3 y 4). Murphy, et al (57) señalan que el PMA provoca una rápida desensibilización de la adenilato ciclasa estimulada por glucagon y con una total recuperación después de 30 minutos, esto difiere de nuestros resultados ya que nosotros observamos una desensibilización más lenta y ninguna recuperación, posiblemente las diferencias radiquen en que nosotros

empleamos ratas hipotiroideas para el estudio y ellos ratas normales, sugiriendo una mayor sensibilidad en las hipotiroideas.

Por otro lado, observamos que las concentraciones de PMA requeridas para inducir un máximo de desensibilización de la ciclasa son mayores que las necesarias para inducir una inhibición de la acción alfa-1 adrenérgica en ratas controles (83), mostrando que el sistema fosfoinosítidos-calcio es más sensible a las acciones del PMA que el sistema de la adenilato ciclasa.

El siguiente paso consistió en ver a que nivel estaba ocurriendo la desensibilización, cualquiera de los componentes del sistema de la adenilato ciclasa podía ser blanco de la acción de la PKC. Para investigar el posible sitio de lesión se utilizaron membranas aisladas de células preincubadas con y sin PMA, en las cuales se determinó la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por glucagon, isoprenalina, Gpp(NH)p que actúa vía las proteínas G o forskolina que activa directamente a la ciclasa. Los resultados muestran que el PMA no afecta la activación por forskolina, lo cual sugiere que la adenilato ciclasa no es afectada por la PKC; sin embargo la estimulación de la ciclasa por las hormonas así como por el Gpp(NH)p disminuye en un 20 a 30%. Estos resultados sugieren que posiblemente la acción de la PKC sea a nivel de la proteína reguladora Gs. Esta alteración sobre la proteína Gs ha sido también observada en otros estudios

por Murphy, et al (57), Heyworth, et al (54), Meurs, et al (48) y García-Sáinz, et al (56).

Sin embargo no siempre la proteína Gs es alterada por la activación de la PKC mediante los ésteres de forbol, Liles, et al (41) y Minami, et al (75) refieren que estos activadores de la PKC provocan internalización y posterior reciclamiento o degradación de los receptores. Por otro lado Yoshimasa, et al (59) han mostrado que los ésteres de forbol inducen fosforilación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa en eritrocitos de rana. En este sistema se induce un aumento en la actividad de la ciclasa, lo que indica que no necesariamente la acción de la PKC puede provocar desensibilización.

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que la isoprenalina induce una desensibilización de tipo homólogo en hepatocitos de ratas hipotiroideas (46) lo que nos llevó a investigar que ocurriría si se inducían simultáneamente las desensibilizaciones homóloga y heteróloga, para ello se preincubaron a las células con isoprenalina, con PMA y con ambos agentes, después se determinó la actividad de la adenilato ciclasa en membranas y la acumulación de AMPc en células intactas. Los resultados muestran que el pretratamiento con PMA disminuye la actividad de la ciclasa estimulada por isoprenalina, glucagon y Gpp(NH)p, pero no afecta la acción de la forskolina (tabla I). Estos datos muestran la desensibilización heteróloga inducida por el PMA. Cuando las células son preexpuestas a isoprenalina, solamente la

respuesta a este agonista se ve disminuida, mostrando así la desensibilización de tipo homólogo. La preincubación con isoprenalina más PMA muestra que las desensibilizaciones homóloga y heteróloga son claramente aditivas, lo que señala que ocurren a distintos niveles. Se sugiere que la desensibilización homóloga B-adrenérgica esta dada por una alteración a nivel del receptor (46), mientras que la heteróloga parece ser a nivel de la proteína reguladora Gs. Los datos obtenidos en células intactas son parecidos a los obtenidos con membranas, mostrando esta misma aditividad. Toews, et al (50), realizaron un estudio muy similar al nuestro, con células de astrocitoma como sistema, y encontraron también una aditividad entre las desensibilizaciones inducidas por PMA y por los agonistas, lo cual les indica que estan ocurriendo por diferentes mecanismos. Ellos sugieren que la inducida por el agonista es por una internalización del receptor, pero desconocen el mecanismo que lleva a este fenómeno. Respecto a la desensibilización heteróloga inducida por el PMA, observan que este agente no afecta la actividad de la adenilato ciclasa estimulada por fluoruro o forskolina. Esto les sugiere que la desensibilización resulta de cambios en diferentes receptores, lo que es poco probable, o bien de un cambio en un sitio de la proteína Gs implicado en la activación de la ciclasa por el receptor, pero no en el implicado en la activación por fluoruro o forskolina, sin embargo puede haber otras posibilidades. La proteína Gs puede ser el sitio afectado

pero aún no han podido demostrarlo.

Existen algunos reportes que señalan que la toxina pertussis puede bloquear algunos procesos de desensibilización (51,81), esto nos condujo a estudiar su efecto en nuestro sistema, para lo cual se utilizaron hepatocitos de ratas hipotiroideas tratadas con toxina pertussis y se determinó la actividad de la adenilato ciclasa tanto en membranas como en células intactas. Los resultados muestran que la desensibilización homóloga no se ve afectada por la acción de la toxina, lo cual confirma resultados previos (46) y se correlaciona con los de otros autores (82); mientras que la desensibilización de tipo heterólogo es claramente bloqueada por la toxina pertussis.

No se sabe a que nivel está actuando la toxina ni la forma en la cual bloquea el efecto del PMA. Rich, et al (53) muestran que el glucagon induce una desensibilización de tipo heterólogo de la adenilato ciclasa en la línea celular MDCK de riñón, sugieren que la desensibilización es a nivel de las proteínas G, a través de un incremento en los niveles de Gi. En nuestro sistema un aumento en los niveles de Gi es una posibilidad que no puede ser descartada, sin embargo nuestros datos muestran que la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa, directamente con forskolina no es afectada por el PMA; considerando que la acción de la forskolina es utilizada como un índice de la acción de Gi, ya que se sabe que un aumento en los niveles de Gi disminuye la acción de la

forskolina sobre la ciclasa, esto sugiere que en nuestro sistema es poco probable que un aumento en G_i sea consecuencia de la acción del PMA.

El hecho de que los resultados muestren que el PMA provoca una alteración sobre G_s y por tanto una inhibición de la adenilato ciclasa, así como el efecto de la toxina pertussis sobre la acción del PMA, señalan una importante interacción entre los componentes regulatorios G_s y G_i . Se están realizando estudios para aclarar la naturaleza de este proceso de desensibilización.

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados en el presente estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El PMA provoca una desensibilización de tipo heterólogo de la respuesta celular a hormonas asociadas activatoriamente al sistema de la adenilato ciclasa.
- La desensibilización inducida por el PMA esta dada por una activación de la proteina cinasa C, esto es una evidencia de que existe una interacción entre los dos sistemas de transducción.
- La desensibilización provocada por el PMA es dependiente del tiempo y de la dosis.
- Las desensibilizaciones homóloga y heteróloga son claramente aditivas, lo cual indica que ocurren a distintos niveles. La toxina pertussis revierte la segunda pero no la primera, lo que apoya esta conclusión.
- Los datos sobre actividad de la adenilato ciclasa estimulando con Gpp(NH)p y con forskolina, sugieren que probablemente la desensibilización heteróloga inducida por el PMA es a nivel de la proteína reguladora Gs.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Snyder, S.H. 1985. *Sci. Amer.* 253 (4): 114-123.
- 2.- García-Sáinz, J.A. 1987. FCE-SEP, México. 108 pp.
- 3.- Ariens, E.J. 1983. *Pharmac. Weekb. Sci. Ed.* 5:121-127.
- 4.- Hollenberg, M.D. and P. Cuatrecasas. 1979. en *Receptors: General principles and procedures*. R. O'Brien (ed). Plenum Press, New York. Vol. 1, 193-214 pp.
- 5.- García-Sáinz, J.A. 1987. en *Mensaje Bioquímico*. vol. X. 177-210 pp.
- 6.- Birnbaumer, L., J. Codina, R. Mattera, R. A. Cerione, J.D. Hildebrandt, T. Sunyer, F.J. Rojas, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and R. Iyengar. 1985. en "Molecular mechanism of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay ed.) Elsevier. Netherlands. 3-56 pp.
- 7.- Rodbell, M. 1980. *Nature*. 284: 17-22.
- 8.- Northup, J.K. 1985. en "Molecular mechanisms of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay, eds.). Elsevier. Netherlands. 91-116 pp.
- 9.- García-Sáinz, J.A. 1985. *La Toxina Pertussis*. *Ciencia*. 36: 97-103.
- 10.- Exton, J.H. 1985. *J. Clin. Invest.* 75: 1753-1757.
- 11.- Williamson, J., R.H. Cooper, S.K. Joseph and A.P. Thomas. 1985. *Am. J. Physiol.* 248 (Cell Physiol. 17): C203-C216.

- 12- Berridge M.J. and R.F. Irvine. 1984. *Nature*. 312: 315-321.
- 13- Nishizuka, Y. 1984. *Nature*. 308: 693-698.
- 14- Berridge, M.J. 1984. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- 15- Doves, C.P. and R.H. Michel. 1985. en "Molecular mechanisms of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay, eds.). Elsevier. Netherlands. 3-56 pp.
- 16- Suresh, K.J. and J.R. Williamson. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 14658-14664.
- 17- Kuo, J.F., R.G.G. Anderson, B.C. Wise, L. Mackerlova, I. Salomonsson, N.L. Brackett, N. Katoh, M. Shoji and R.W. Wrenn. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 7039-7043.
- 18- Nishizuka, Y. 1986. *Science*. 233: 305.
- 19- Murray, A.W. 1987. *TIBS*. 12: 53-54.
- 20- Castagna, M., Y. Takai, K. Kaibuchi, K. Sano, U. Kikkawa and Y. Nishizuka. 1982. *J. Biol. Chem.* 257(13): 7847-7851.
- 21- Hokin, L.E. 1985. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 205-235.
- 22- Lehninger, A. 1982. *Bioquímica*. Omega, Barcelona. 1117 pp.
- 23- Goodman, L.S. y A. Gilman. 1978. *Bases farmacológicas de la terapéutica*. Interamericana, México. 1412 pp.
- 24- Corvera, S., J. Huerta-Baena, J.T. Pelton, V.J. Hruby, D. Trivedi and J.A. García-Sáinz. 1984. *Bioch. et Bioph. Acta*. 804: 434-441.

- 25- García-Sáinz, J.A., L. Sánchez-Sevilla, J.T. Pelton,
D. Trivedi and V.J. Hruby. 1986. *Bioch. et Bioph.*
Acta. 886: 310-315.
- 26- Wakelam, M., G. Murphy, V. Hruby and M. Houslay. 1986.
Nature. 323: 68-71.
- 27- Petersen, O.H. and C. Bear. 1986. *Nature.* 323:18.
- 28- Carmichel, S.W. and H. Winkler. 1985. *Sci. Amer.*
: 18-29.
- 29- Goodhardt, M. N. Ferry, M. Aggerbeck and J. Hanoune.
1984. *Bioch. Pharm.* 33(6): 863-868.
- 30- Fain, J.N. and J.A. García-Sáinz. 1980. *Life Sciences.*
26(15): 1183-1194.
- 31- Fain, J.N. and J.A. García-Sáinz. 1983. *J. Lip. Res.*
24: 945-966.
- 32- Exton, J.H. 1985. *Am. J. Physiol.* 248(Endocrinol.
Metab. 11): E633-E647.
- 33- Ariens, E.J., A.J. Beld, J.F. Rodríguez de Miranda,
and A.M. Simonis. 1979. en *Receptors*, vol. 1. *General
Principles and Procedures*, (O'Brien ed.). Plenum
Press, New York. 33-91 pp
- 34- Berridge, M.J. 1985. *Sci. Amer.* 253(4): 124-134.
- 35- Kunos, G. and E. J. Ishac. 1987. *Biochem. Pharmal.*
36(8): 1185-1191.
- 36- García-Sáinz, J.A. and A. Nájera-Alvarado. 1986.
Biochem. Biophys. Acta. 885: 102-109.
- 37- Malbon, C.C. 1980. *J. Biol. Chem.* 255(18): 8692-8699.

- 38- Sibley, D.R., P. Nambi and R.J. Lefkowitz. 1985. en "Molecular mechanisms of transmembrane signalling". (Cohen and Houslay eds.). Elsevier. Netherlands. 359-374 pp.
- 39- Harden, T.K. 1983. Pharmacol. Rev. 35: 5-32.
- 40- Lefkowitz, R.J., R.M. Wessels and J.M. Stadel. 1980. en "Current Topics in cellular regulation", vol. 17. Academic. Press. Inc. 205-230 pp.
- 41- Liles, W.C., D.D. Hunter, K.E. Meier and N.M. Nathanson. 1986. J. Biol. Chem. 261(12): 5307-5313.
- 42- Morrison, W.J. and S.D. Shukla. 1987. Molec. Pharm. 33: 58-63.
- 43- Blake, A.D., N. S. Hayes, E.E. Slater and C.D. Strader. 1987. Biochem. J. 245: 357-364.
- 44- Benovic, J.L., L.J. Pike, R.A. Cerione, C. Staniszewski, T. Yoshimasa, J. Codina, M.G. Caron and R.J. Lefkowitz. 1985. J. Biol. Chem. 260(11): 7094-7101.
- 45- Leeb-Lundberg, L.M.F., S. Cotecchia, A. De Biasi, M.G. Caron and R.J. Lefkowitz. 1987. J. Biol. Chem. 262(7): 3106-3113.
- 46- García-Sáinz, J.A. and B. Michel. 1987. Biochem. J. 246: 331-336.
- 47- Kelleher, D.J., J.E. Pessin, A.E. Ruoho and G.L. Johnson. 1984. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 4316-4320.
- 48- Meurs, H., H.F. Kauffman, A. Timmermans, F.T.H.M. Van Amsterdam, G.H. Koeter and K. De Vries. 1986. Bioch. Pharmacol. 35(23): 4217-4222.

- 49- Refsnes, M., D. Sandnes and T. Christoffersen. 1987.
Eur. J. Biochem. 163: 457-466.
- 50- Toews, M.L. M. Liang and J.P. Perkins. 1987. Mol.
Pharm. 32: 737-742.
- 51- Heyworth, C.M., E. Hanski and M.D. Houslay. 1984.
Biochem J. 222: 189-194.
- 52- Noda, C., F. Shinjyo, A. Tomomura, S. Kato, T.
Nakamura and A. Ichihara. 1984. J. Biol. Chem.
259(12): 7747-7754.
- 53- Rich, K.A., J. Codina, G. Floyd, R. Sekura, J.D.
Hildebrandt and R. Iyengar. 1984. J. Biol. Chem.
259(12): 7893-7901.
- 54- Heyworth, C.M., A.D. Whetton, A.R. Kinsella and M.D.
Houslay. 1984. FEBS. 170(1): 38-42.
- 55- Heyworth, C.M., S.P. Wilson, D.J. Gauler and M.D.
Houslay. 1985. FEBS. 187(2): 196-200.
- 56- García-Sáinz, J.A., F. Mendlovic and M.A. Martínez-
Olmedo. 1985. Biochem. J. 228: 277-280.
- 57- Murphy, G.J., V.J. Hruby, D. Trivedi, M.J.O. Wakelam
and M. D. Houslay. 1987. Biochem. J. 243: 39-46.
- 58- Grady, T., M. Fickova, H.S. Tager, D. Trivedi and V.J.
Hruby. J. Biol. Chem. 262(32): 15514-15520.
- 59- Yoshimasa, T., D.R. Sibley, M. Bouvier, R.J. Lefkowitz
and M.G. Caron. 1987. Nature. 327: 737-742.
- 60- Bouvier, M., L.M.F. Leeb-Lundberg, J.L. Benovic, M.G.
Caron and R.J. Lefkowitz. 1987. J. Biol. Chem. 262(7):
3106-3113.

- 61- Benovic, J.L. R.H. Strasser, M.G. Caron and R.J. Lefkowitz. 1986. Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 2797-2801.
- 62- Benovic, J.L., J.W. Reagan, H. Matsui, F. Mayor Jr., S. Cotecchia, L.M.F. Leeb-Lundberg, M.G. Caron and R. J. Lefkowitz. 1987. J. Biol. Chem. 262(36): 17251-17253.
- 63- Sekura, R.D., F. Fish, C.R. Manclark, B. Meade and Y.L. Zhang. 1983. J. Biol. Chem. 258: 14647-14651.
- 64- Berry, M.N. and D.S. Friend. 1969. J. Cell. Biol. 43: 506-520.
- 65- Tolbert, M.E.M., A.C. White, K. Aspary, J. Cutts and J.N. Fain. 1980. J. Biol. Chem. 255: 1938-1944.
- 66- Loten, E.G. and J.C. Redshaw-Loten. 1986. Anal. Biochem. 154: 183-185.
- 67- Gutman, I. and H.V. Bergmeyer. 1974. in Methods of Enzymatic Analysis. (H.V. Bergmeyer, ed). Vol. 4. Academic Press, New York. 1791-1793.
- 68- Gilman, A.G. 1970. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 67: 305-312.
- 69- Salomon, Y., C. Londos and M. Rodbell. 1974. Anal. Biochem. 58: 541-548.
- 70- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 71- González, R.A. and F.T. Crews. 1985. J. Biochem. 232: 799-804.
- 72- Pfeilshifter J. and C. Bauer. 1986. J. Biochem. 236: 289-294.

- 73- Theibert, A.B., S. Supattapone, P.F. Worley, J.M. Baraban, J.L. Meek and S.H. Snyder. 1987. *J. Biol. Chem.* 148(3): 1283-1289.
- 74- Dautry-Varsat, A. and H.F. Lodish. 1984. *Sci. Amer.* (5): 48-54.
- 75- Minami, Y., L.E. Samelson and R.D. Klausner. 1987. *J. Biol. Chem.* 262(27): 13342-13347.
- 76- Kwatra, M.M., E. Leung, A.C. Maan, K.K. Mc Mahon, J. Ptasienski, R.D. Green and M.M. Hosey. 1987. *J. Biol. Chem.* 262(34): 16314-16321.
- 77- Hernández-Sotomayor, S.M.T., M. Macías-Silva, M. Plebański and J.A. García-Sáinz. 1988. *Biochem. Biophys. Acta.* (Sometido).
- 78- Hildebrandt, J.D., J. Codina and L. Birnbauer. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 13178-13185.
- 79- Katada, T., J.K. Northrup, G.M. Bokoch, M. Ui and A.G. Gilman. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 3578-3585.
- 80- García-Sáinz, J.A. 1985. en "Pertussis Toxin" (Sekura, Moss and Vaughan, Eds.) Academic Press. USA. 205-224.
- 81- Wilson, P.D., B.S. Dixon, M.A. Dillingham, J.A. García-Sáinz and R.J. Anderson. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 1503-1506.
- 82- Clark, R.B., T.J. Goka, M.A. Proll and J. Friedman. 1986. *Biochem. J.* 235: 399-405.

- 83- Garcia-Sáinz, J.A., S.M.T. Hernández-Sotomayor and
M.I. Tussié-Luna. 1986. *Biochim. Biophys. Acta.* 887:
73-79.
- 84- Brown, B.L., J.D.M. Albano, P. Ekins and A.M.
Sgherzi. 1971. *Biochem. J.* 121, 561-562.