

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



INTERRELACION AMP-CICLICO - HORMONAS

T E S I S
Que para obtener el Título de
Q U I M I C O
P r e s e n t a

IGNACIO LEGOFF GONZALEZ

1 9 7 7



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

COMISSÃO DE AVALIAÇÃO ACADÊMICA DE GRADUAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

.. Tesis 1977
.. M-228 237

•CHA _____
•ROC _____
• _____

EXAMEN DE AVALIAÇÃO ACADÊMICA DE GRADUAÇÃO



QUÍMICA

PRESIDENTE: GUADALUPE VELEZ P.

VOCAL: FEDERICO GARCIA J.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

SECRETARIO: ANGELINA QUINTERO R.

1er. SUPLENTE: MA. DOLORES LASTRA

2do. SUPLENTE: GUILLERMO RENDON P.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

INSTITUTO DE QUIMICA

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

IGNACIO LEGOFF GONZALEZ

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

FEDERICO GARCIA JIMENEZ

ESTA TESIS SE LLEVO A CABO EN
EL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION
DEL DR. FEDERICO GARCIA JIME-
NEZ A QUIEN EXPRESO TODO MI
AGRADECIMIENTO.

A mi mamá, fuente de luz, bondad y
sabiduría.

Con todo cariño para mis
hermanas .

Para mis tíos y primos, para que
sean partícipes de este logro.

A mi papá, con respeto y
satisfacción.

Para tí Claudia, inspiración
de mi éxito y culminación de
mi felicidad. Con todo mi -
amor.

A mis amigos.

A mis maestros, de quienes
guardo tan gratos recuer -
dos.

I N D I C E .

INTRODUCCION	Página 1
OBJETIVO	Página 2
ANTECEDENTES	Página 3
CAPITULO I	
Interacción entre Hormonas y - AMP cíclico	Página 11
CAPITULO II	
Papel del AMP cíclico en la Re- gulación de la Actividad Enzimá tica.	Página 19
CAPITULO III	
Efecto Transcripcional del AMP- cíclico.	Página: 31
CAPITULO IV	
Hipótesis del Mecanismo de ac - ción del AMP cíclico.	Página 39
CONCLUSIONES	Página 51
BIBLIOGRAFIA	Página 54

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

En el mundo de los organismos vivientes móviles se ha observado que los procesos enzimáticos intracelulares son afectados por influencias extracelulares. En las bacterias, la disponibilidad de nutrientes o la presencia de materiales nocivos -- producen cambios y en organismos multicelulares además entran en juego mecanismos endócrinos y/o nerviosos. Muchas hormonas actúan regulando el nivel intracelular de un pequeño nucleótido cíclico, el adenosín, 3', 5'-monofosfato cíclico, el cual se llama comúnmente AMP cíclico. Esta relación condujo a formular la hipótesis del segundo mensajero en la acción hormonal.

La hormona es el primer mensajero; circula en la sangre, se une a la membrana celular de la célula objetivo y activa la adenilato ciclasa. El AMP cíclico, un segundo mensajero, se genera en la superficie interna de la membrana celular, se difunde dentro de la célula y ocasiona las respuestas fisiológicas adecuadas. (Figura 1)

Por ahora los únicos segundos mensajeros bien definidos son el adenosín 3', 5'-monofosfato y el guanosín 3', 5'-monofosfato (GMP cíclico).

Para establecer que una hormona actúa a través del AMP cíclico, se han sugerido cuatro criterios: 1.- la hormona deberá incrementar concentraciones de AMP cíclico en su tejido objetivo. 2.- la hormona deberá incrementar la actividad de la adenilato ciclasa en extractos de tejidos. 3.- la teofilina (la cual inhibe la ruptura de AMP cíclico a adenosín 5'-monofosfato y con ello incrementa su concentración en los tejidos) deberá imitar o incrementar la acción de la hormona. 4.- el AMP cíclico

co o un análogo apropiado deberá imitar la acción de la hormona.

O B J E T I V O :

El objetivo del presente trabajo es doble. En primer lugar se persigue lograr una visión de conjunto en el complejo campo de las interacciones entre hormonas y la substancia - AMP cíclico.

En segundo lugar se pretende proponer un papel transcripcional más amplio para la acción del AMP cíclico y su interacción con algunas hormonas. En este punto se cae dentro del campo de la hipótesis que algunas personas podrán juzgar especulativo. Cabe recordar sin embargo, que en gran parte la ciencia ha avanzado gracias a especulaciones, pues éstas conducen a realizar experimentos críticos que podrán afirmar o contradecir las hipótesis previas, conformándose así el cuerpo de teoría en un campo determinado.

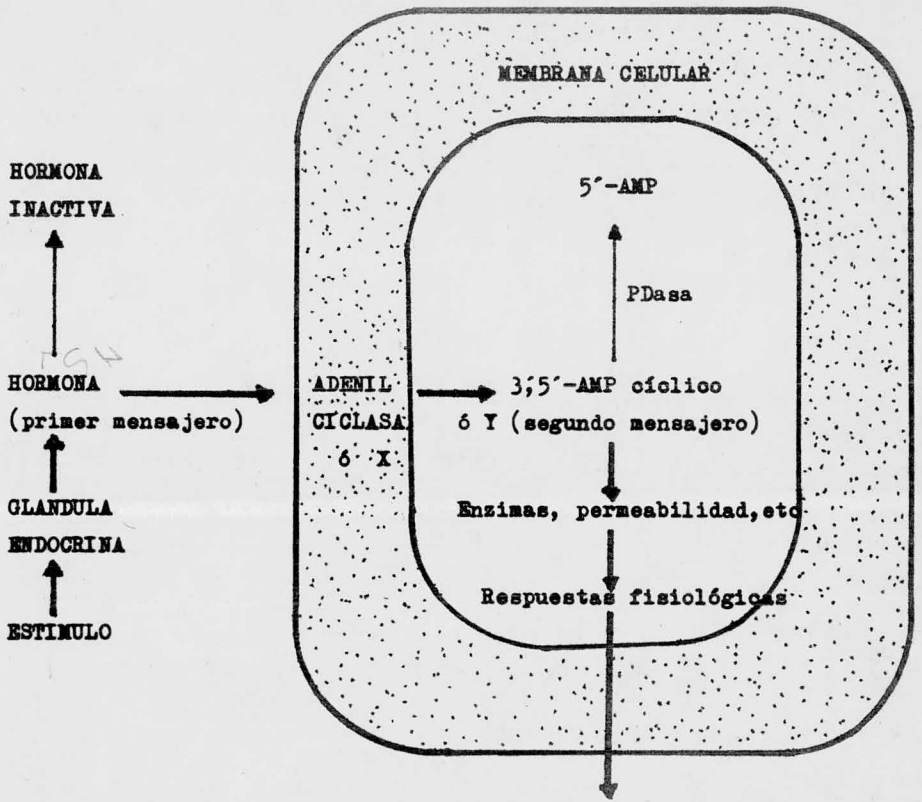


Figura 1. El sistema del segundo mensajero

A N T E C E D E N T E S

A continuación se hará una breve relación de los experimentos que llevaron al descubrimiento del AMP cíclico. Principió en 1956 por Earl W. Sutherland (1,2,3), con los estudios sobre el mecanismo por el cual las catecolaminas y el glucagón estimulaban la glucogenólisis en el hígado, se encontró que el paso limitante de la velocidad entre el glucógeno y la glucosa era la glucógeno fosforilasa y que al nivel de esta enzima las hormonas actuaban para estimular el mecanismo glucogenolítico. - (Figura 6).

Se identificaron posteriormente formas activas e inactivas de la glucógeno fosforilasa (4) y esto manifestó que las hormonas alteraban el equilibrio de la balanza de las fosforilasas-- hacia la forma activa. También proporcionaron una valiosa información los estudios con fosforilasa hepática activa altamente purificada y la enzima inactivada reversiblemente. Por cada mol de fosforilasa se liberaron dos moles de fosfato inactivándose la enzima, sugiriendo que la reacción contraria (activación) podría involucrar fosforilación. Este resultó ser el caso, identificándose y aislándose una enzima capaz de activar la defosforilasa por fosforilación a expensas del fosfato terminal de dos moles de ATP.

Estudios con fracciones subcelulares de homogenados de hígado proporcionaron algunos resultados muy estimulantes. Homogenados completos enriquecidos con Mg^{+2} , ATP y fosforilasa inactiva respondieron a las catecolaminas y glucagón con incrementos muy marcados a la actividad de la fosforilasa (3). Recíprocamente, no obstante que las cuatro enzimas involucradas son solubles, fracciones sobrenadantes no respondieron a las hormonas. Sin embargo, cuando se adicionaron a los sobrenadantes del hígado fracciones particuladas lavadas se restablecieron los efectos de las hormonas sobre la activación de la fosforilasa (5).

Los experimentos de suplementación demostraron que las fracciones particuladas elaboraban un factor estable al calor sintetizado a partir de ATP y que las hormonas actuaban para incrementar la cantidad de dicho factor estable. Este fué purificado por cromatografía de intercambio iónico y se encontró que contenía adenina, ribosa y fosfato en la relación 1:1:1 (3). Una identificación posterior del compuesto sería muy difícil debido a las cantidades mínimas producidas por los sistemas particulados y fué por ello muy afortunado que Lipkin y sus colaboradores (6) hubieran encontrado un compuesto producido durante la digestión de ATP con hidróxido de bario el cual tenía propiedades similares. Ambos grupos escribieron al doctor León Heppel solicitando enzimas purificadas para ayudar en la identificación de sus compuestos y él reconoció similitudes en las estructuras tentativas y sugirió que las muestras debían ser intercambiadas. Al compararlos se encontró que los dos compuestos eran idénticos; de esta manera se encontraron disponibles grandes cantidades de AMP cíclico por síntesis orgánica. (Figura 2)

El AMP cíclico se ha identificado casi sin excepción en los tejidos de organismos multicelulares que se han estudiado a la fecha, en varios organismos unicelulares, en una variedad de líquidos de los mamíferos y en algunas células vegetales. En general, en ausencia de estimulación por hormonas exógenas, las concentraciones intracelulares de AMP cíclico son de orden de 0.1-1.0 n-moles por gramo de tejido (húmedo). Suponiendo una distribución uniforme de AMP cíclico dentro del líquido intracelular, las concentraciones de AMP cíclico serán de 1×10^{-7} y 1×10^{-6} M. En contraste con las concentraciones de ATP las cuales son del orden de 5×10^{-3} M y ADP y 5'-AMP que son un orden de magnitud más pequeñas, se ve que las concentraciones de AMP cíclico en las células están entre 1/1000 y 1/10000 con relación a los otros nucleótidos de la adenina. Las concentraciones de AMP cíclico en plasma-

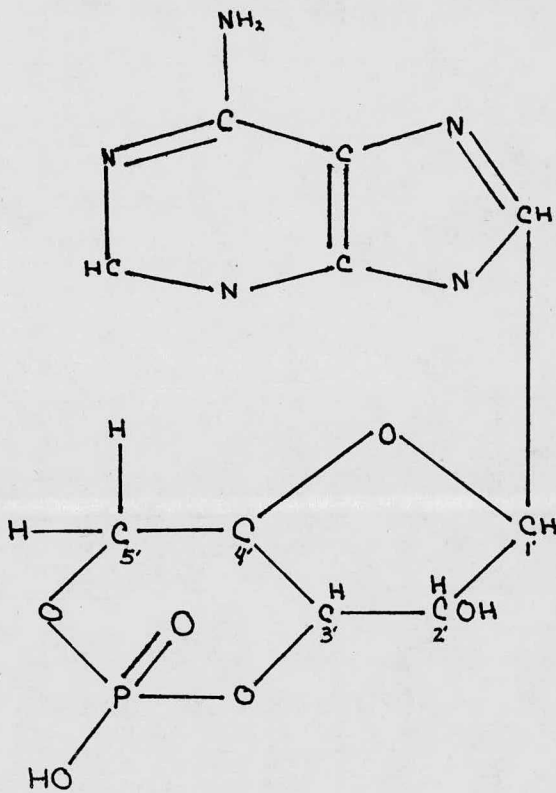


Figura 2. Fórmula estructural del adenosín 3,5'-monofosfato.

líquido cefalorraquídeo y jugo gástrico, son del orden de 10^{-8} M y en la leche y orina alrededor de 10^{-6} M. El significado del AMP cíclico en estos líquidos es incierto.

Mientras que la concentración de AMP cíclico en la célula en ausencia de estímulos hormonales es relativamente constante los cambios engendrados por hormonas, son tanto dramáticos como extraordinariamente diferentes de un tejido a otro. Por ejemplo, la inyección de HACT (hormona adrenocortical) en ratas hipofisectomizadas estimularon tanto las células de la corteza adrenal que las concentraciones intracelulares de AMP cíclico se aproximaron a aquéllas de ATP (7). Similarmente, el glucagón es capaz de incrementar los niveles del AMP cíclico en más de ochenta veces en el hígado aislado de rata. Sin embargo, el significado fisiológico de estos estudios es escaso puesto que las concentraciones de hormonas requeridas para realizarlos, son mucho mayores que las que se pueden tener en condiciones fisiológicas. En suma, éste, parece incapaz de sufrir esos cambios tan notables en sus concentraciones intracelulares. Por ejemplo, en células grasas aisladas, concentraciones máximas de hormonas lipolíticas incrementan los niveles de AMP cíclico tan sólo de dos a cinco veces, a menos que estuviera presente un inhibidor de la fosfodiesterasa.

Debe notarse que los cambios en los niveles de AMP cíclico necesarios para una máxima activación de los sistemas correspondientes que han sido estudiados son extremadamente pequeños. Un ejemplo de eso se presenta en la Figura 3 en la cual la velocidad del lipólisis se grafica contra los niveles de AMP cíclico medido. No obstante que la lipólisis se estimuló al máximo cuando los niveles de AMP cíclico se incrementaron ligeramente por encima del doble, los mecanismos del AMP cíclico continuaron respondiendo a estímulos crecientes en una forma proporcional. Este tipo de reacciones se ha encon-

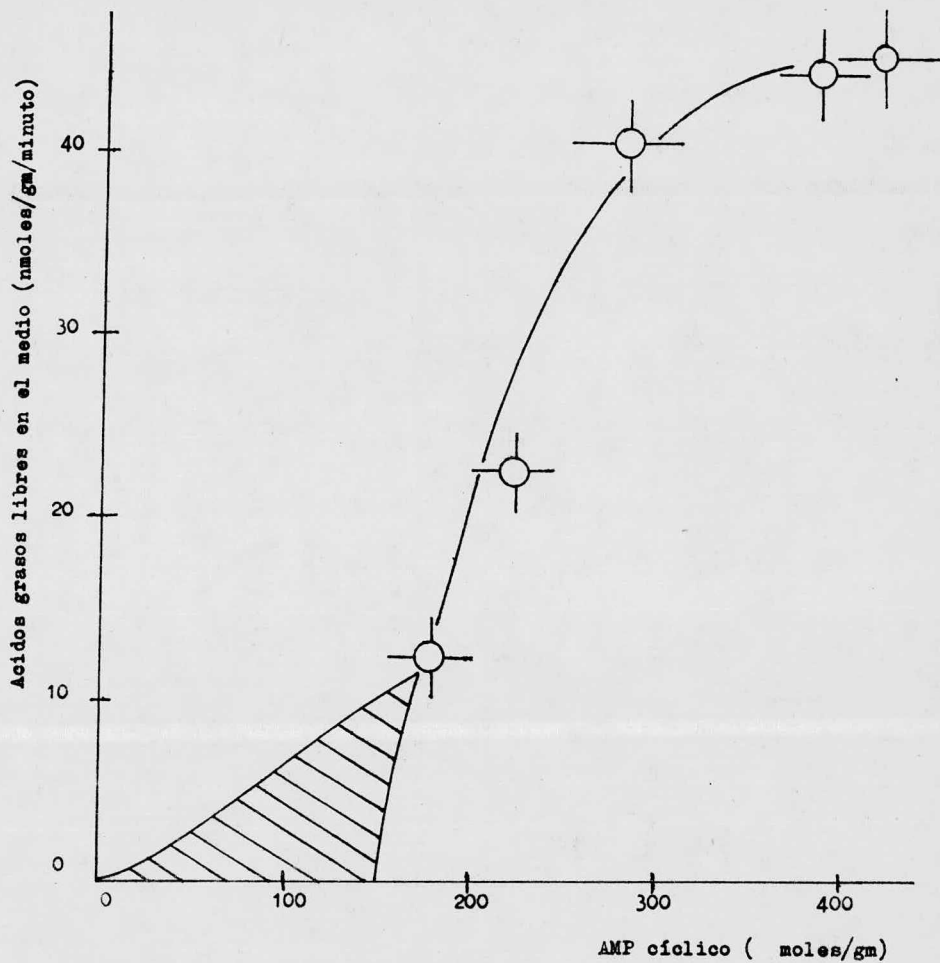
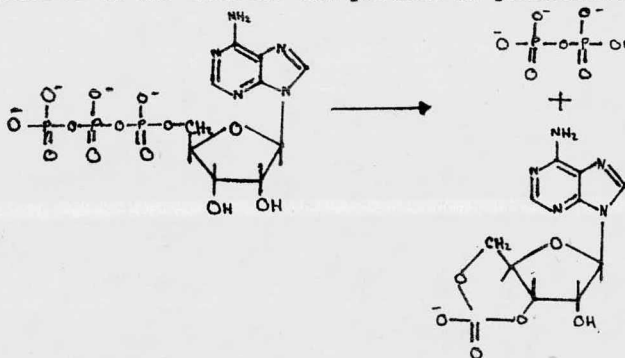


Figura 3. Relación entre niveles de AMP ciclico y ácidos grasos libres.
Butcher y colaboradores (17).

trado en un gran número de sistemas y es de hecho predecible. - La razón de esto no está clara, pero en vista de lo que se conoce acerca del mecanismo de acción del AMP cíclico sobre algunos sistemas, por ejemplo el caso de la fosforilasa, no es de sorprendernos. El incremento que surge en tal sistema es obvio y un cambio aritmético en el nivel de AMP cíclico puede producir un efecto mucho mayor que aritmético (quizás logarítmico) al final del proceso que está controlando.

Investigaciones posteriores (8), revelaron que la epinefrina estimula grandemente una reacción enzimática dependiente de Mg^{+2} en la fracción de membrana plasmática, en la cual el ATP se convierte en AMP cíclico con pérdida de pirofosfato.



La enzima que cataliza esta reacción es la adenilato ciclasa. No obstante que es claro que muchas hormonas trabajan a través de cambios en los niveles de AMP cíclico y está igualmente bien establecido que esto lo realizan activando el sistema adenilato ciclasa, poco se conoce acerca de la interacción de hormonas y dicha enzima y más aún lo que este sistema es, aunque cabe señalar que posee características de una lipoproteína situada en la membrana celular así como en otras membranas diferentes de la membrana plasmática. La reversibilidad de la reacción quedó demostrada, aunque no parezca claro que ésta tenga algún significado fisiológico, puesto que los niveles intracelulares de pirofosfato son bajos, pero el hallazgo de que la reacción contraria ocurría fué de interés puesto que proporcionó evidencia de que -

la energía libre de hidrólisis del enlace 3' del AMP cíclico era aún mayor que el del fosfato terminal del ATP.

La adenilato ciclasa está presente en organismos unicelulares, en casi todos los tejidos de animales de laboratorio y en varias otras especies incluyendo el hombre. En plantas superiores tan sólo ha sido encontrado AMP cíclico, aunque es de suponerse la existencia de la enzima generadora (9,10,11).

En la mayoría de las acciones hormonales que involucran incrementos de los niveles del AMP cíclico se ha demostrado la activación de la adenilato ciclasa por hormonas apropiadas. En tanto que se conoce poco acerca del mecanismo exacto del sistema adenilato ciclasa, se conoce bastante acerca de la especificidad operacional de la enzima por hormonas en los mamíferos. Para que una hormona dada estimule al adenilato ciclasa en un tejido dependerá presumiblemente de que contenga o no receptores para esa hormona.

Una pregunta que debemos considerar en este punto es acerca de la relación entre los receptores para hormonas y la adenilato ciclasa. ¿Son los receptores parte del sistema enzimático o son parte de algún otro sistema el cual estimula secundariamente a la adenilato ciclasa como una de sus funciones?

La respuesta a esta pregunta se desconoce. El principal impedimento para contestarla ha sido la imposibilidad de obtener una preparación purificada de adenilato ciclasa sensible a la hormona, lo cual está relacionado a la naturaleza particular y altamente lábil de la enzima (asumiendo que se trata de una sola enzima). Recientemente se ha podido obtener la enzima activa en una forma solubilizada (12).

La mayoría de los investigadores (13,14), se inclinan a favor de que los receptores de la hormona constituyen una parte integral del sistema adenilato ciclasa ya que parece ser la hipóte

sis más simple capaz de explicar los datos con que contamos. Aunque parece que existen diversos receptores y esta es una parte variable dependiente del tejido.

Dos posibles modelos del sistema adenilato ciclasa propuestos por Øye y Sutherland (15) y Cuatrecasas, 1974 (16), que pueden ser usados como una hipótesis de trabajo son los ilustrados en la Figura 4.

En estos modelos los componentes proteínicos se dibujan como consistiendo de al menos dos tipos de subunidades, una subunidad reguladora (R) con su receptor dirigido al exterior y una subunidad catalítica (AC) con su centro activo dirigido hacia el interior de la célula. El receptor se considera como una parte de la subunidad reguladora. La interacción con una hormona lleva a una perturbación conformacional la cual se extiende de la subunidad reguladora a la subunidad catalítica, alterando la actividad de esta última. La subunidad catalítica sería similar en todos los tejidos, mientras que la estructura de la subunidad reguladora podría variar de acuerdo a la especificidad hormonal de cada tejido.

En células en las que dos o más hormonas estructuralmente diferentes son capaces de estimular la adenilato ciclasa, nos podemos preguntar si las hormonas estimulan la misma enzima o si existen enzimas separadas para cada hormona. La evidencia disponible sugiere que todas las hormonas estimulan a la misma enzima, puesto que el efecto de concentraciones de máxima efectividad de las hormonas no es aditivo sino que la actividad de adenilato ciclasa en presencia de dos hormonas, únicamente alcanza la actividad producida por la más efectiva de las dos. En términos del modelo desarrollado en la Figura 4 este resultado podría explicarse postulando una subunidad reguladora diferente para cada hormona unidas a la misma subunidad catalítica o también diferentes receptores en la misma subunidad reguladora. (16).

En las células objetivo de las glándulas sexuales y de la corteza adrenal, las hormonas son esteroides solubles en lípidos y por ello pueden penetrar la membrana celular, los receptores primarios están localizados dentro de la célula, en el citosol.

El complejo hormona-receptor se comporta propiamente como el mensajero transmembranal.

La adenilato ciclasa de la mayoría de los organismos multicelulares se estimula por iones fluoruro. El mecanismo del efecto estimulante del fluoruro no se ha llegado a explicar cabalmente (¿captura de calcio?). A pesar de su diferencia, los iones fluoruro actúan de la misma forma que las hormonas (17,18). El Mn^{+2} puede reemplazar al Mg^{+2} al menos en algunas preparaciones - el Cu^{+2} y el Zn^{+2} son inhibidores bastante fuertes de la adenilato ciclasa. El Ca^{+2} actúa como inhibidor en algunos casos. Sin embargo, existen también ejemplos donde los efectos del calcio parecen influenciar procesos lejanos al sitio de las interacciones hormona-ciclasa. Por ejemplo, el calcio parece interferir con la acción de la vasopresina sobre la permeabilidad de las estructuras de la membrana, mientras que no tiene efecto estimulante sobre la vasopresina en el transporte activo del sodio de la nefrona a la vejiga en ranas (19,20). Se piensa que el calcio es requerido para la liberación de los péptidos en la pituitaria (21). Está claro que la influencia actual del calcio en la activación de la adenilato ciclasa no puede ser descrita en términos moleculares hasta que un completo entendimiento se obtenga para el proceso de comunicación de interacciones hormona-receptor con los elementos catalíticos y todos los componentes participantes de estas interacciones para que quede bien establecida. De algunos ejemplos donde se establece sin lugar a dudas que el calcio no es requerido para una activación en la interacción adenilato ciclasa-hormona peptídica podemos citar el caso de la activación de la adenilato ciclasa en hígado por el glucagón (22).

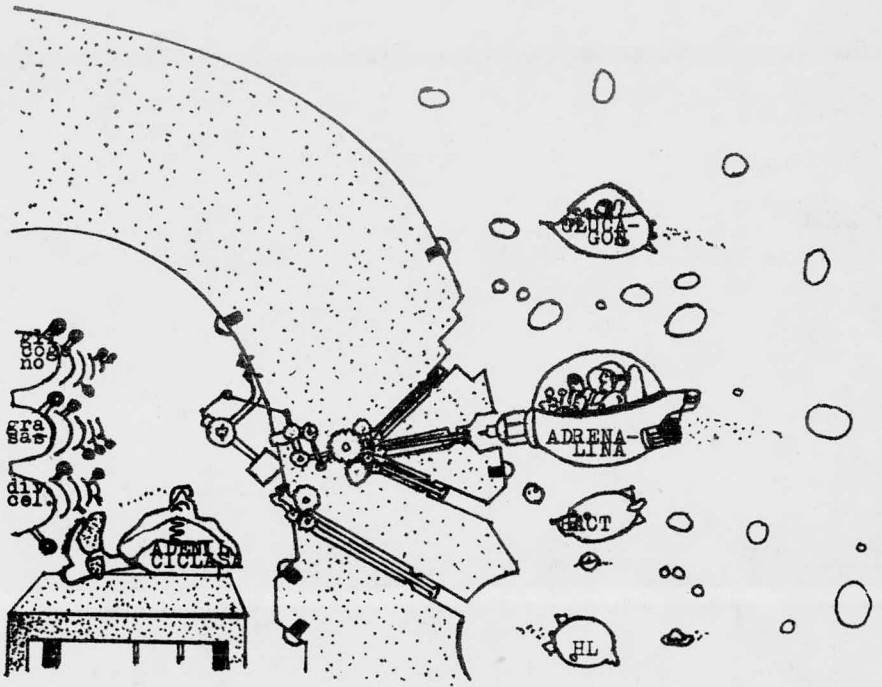
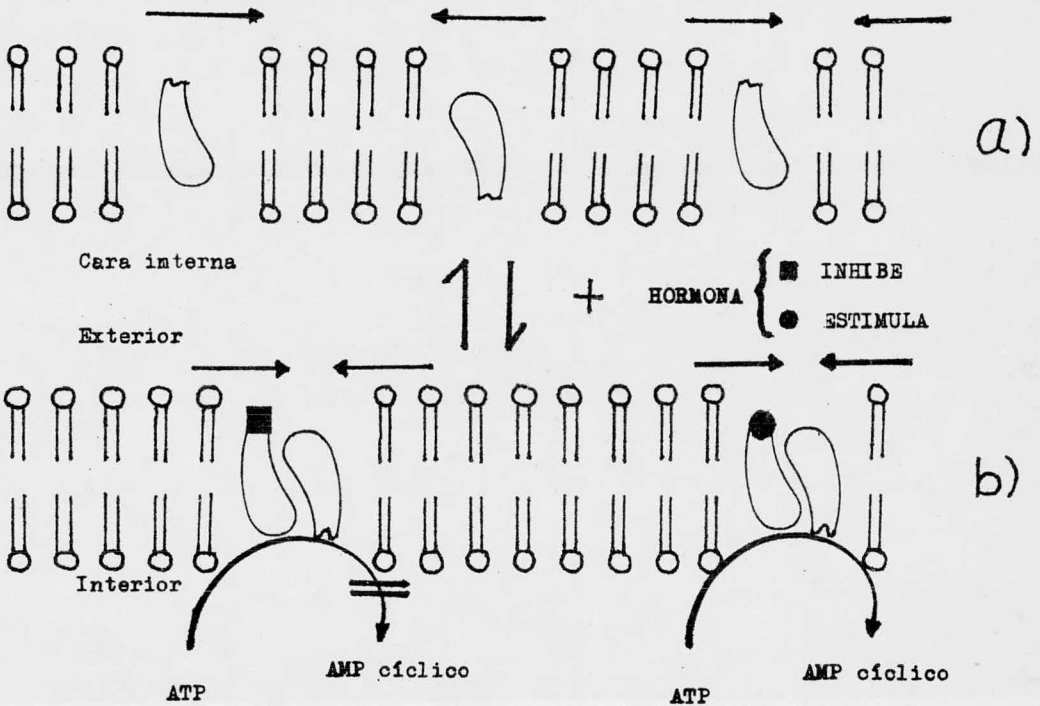


Figura 4. Una concepción práctica, objetiva y sencilla del modelo originalmente propuesto por Øye y Sutherland para el mecanismo de la adenilato ciclasa, el cual básicamente es la estimulación de la adenilato ciclasa por efecto del enlazamiento de la hormona en su sitio receptor específico.

Cara externa de la membrana celular.



- a) Estado de reposo. Ciclasa inactiva
 b) Ciclasa inhibida ó estimulada.

Hipótesis general para el mecanismo regulador de la actividad de la actividad de la adenilato ciclasa en membranas celulares por hormonas que la inhiben ó estimulan. La característica central es que los receptores y la enzima son estructuras discretas y diferentes que adquieren especificidad y afinidad para la formación de un complejo únicamente después de que el receptor enlaza a la hormona. Enseguida de esta unión las estructuras se aproximan una a otra, debido al movimiento que se realiza en la membrana celular. Los sitios enlazantes a la hormona en el receptor están en la parte externa expuestos al medio acuoso y el sitio catalítico de la enzima se encuentra hacia el citoplasma de la célula.

Fosfodiesterasa.- Los estudios iniciales de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDasa) fueron reportados (23) en 1958. La enzima procedente del corazón de perro se purificó parcialmente y el producto de reacción se identificó como 5'-adenosín monofosfato. Se requirió una purificación posterior de la PDasa por problemas involucrados con el análisis del AMP cíclico en tejidos intactos. Se encontró que la K_m de la enzima purificada era del orden de 1×10^{-4} M y era inhibida por cafeína, teofilina, nucleótidos trifosfatos, citrato y algunos otros iones más.

La enzima no hidroliza al AMP 2'-3'-cíclico, nucleótidos lineales, ni tuvo efectos detectables sobre ciertos polinucleótidos.

En 1968 Broocker (24) reportó la presencia de una segunda PDasa activa en fracciones de cerebro con una K_m mucho más baja que aquella encontrada anteriormente.

Desde entonces este tipo de enzima se ha encontrado en un buen número de sistemas. De ahí se reportó que era posible preparar dos formas de la PDasa (25), una de peso molecular del orden de 40,000 y otra alrededor de 80,000 y que la forma de alto peso molecular de la enzima tenía una afinidad relativamente baja por el AMP cíclico y la enzima de bajo peso molecular una afinidad superior. Thomson reportó (26) que únicamente la fracción de peso molecular elevado era activa en presencia de GMP cíclico diesterasa.

Quizás el hallazgo más excitante y singular acerca de la PDasa haya sido el reportado por Loten y Sneyd (27), ellos encontraron que la actividad de PDasa en células grasas aisladas se incrementaba rápidamente incubándolas poco tiempo con concentraciones bajas de insulina. Los efectos sobre la actividad de la PDasa son probablemente suficientes para explicar el efecto de la insulina sobre el decremento de los niveles de AMP cíclico en células grasas, aún cuando esto no explicaría el incremento en GMP asociado con la adición de insulina.

C A P I T U L O I

I N T E R A C C I O N E N T R E H O R -
M O N A S Y A M P

Frecuentemente se define a las hormonas como agentes químicos - que son liberados de un grupo de células y viajan vía el torrente - sanguíneo a afectar uno o más grupos diferentes de células. Esta es la definición clásica, primeramente propuesta por Starling Y Bayliss (28). Otra definición propuesta por Huxley (29) coloca menos énfasis en el modo de viajar de estos agentes y más énfasis sobre su función biológica. De acuerdo a esta definición, las hormonas son vistas primeramente como moléculas transportadoras de información, cuya función esencial es transferir información de un conjunto de células a otro, para el bien de la población celular. Esta definición posee varias características provechosas. Primero, puesto que incluye sustancias neurotransmisoras liberadas a partir de determinaciones nerviosas, enfatiza las similitudes entre los sistemas nerviosos y endócrinos en lugar de las diferencias. Una segunda característica potencialmente útil de esta definición es que es bastante amplia para incluir agentes liberados de organismos unicelulares, los cuales pueden jugar un papel similar a los jugados por hormonas en organismos multicelulares y los cuales pueden también actuar a un nivel bioquímico (30). Esta definición es también útil ya que ayuda a distinguir hormonas de otros tipos de compuestos biológicamente activos. Las vitaminas, por ejemplo, que se relacionan primeramente con el metabolismo energético y no con la transferencia de información (una excepción importante es el caso de la vitamina D).

En términos de la definición clásica, se ve que existen al menos dos tipos diferentes de hormonas. Estos dos tipos no siempre han sido distinguidos uno de otro, quizás, al menos en parte, ya que están clasificados bajo una definición común.

Un tipo incluye epinefrina, glucagón, secretina, hormona paratiroidea, calcitonina y muchas de las hormonas liberadas de los lóbulos anterior y posterior de la glándula pituitaria. Estas y algunas otras hormonas junto con las substancias neurotransmisoras liberadas de las terminaciones nerviosas, se ve claramente que juegan un papel transmisor de información, atribuible a las hormonas por la definición de Huxley. Las células responden a estas hormonas más o menos rápido, y la respuesta es frecuentemente de corta duración o al menos la magnitud de la respuesta a un instante dado está íntimamente relacionado a la cantidad de la hormona presente. Estos mensajeros químicos son de especial interés desde el punto de vista de esta monografía ya que muchos de sus efectos resultan de su habilidad para producir cambios inmediatos en el nivel intracelular del AMP cíclico.

El otro tipo o clase de hormona podría incluir las hormonas esteroidales, hormona tiroidea, y al menos una de las hormonas producidas por la adenohipófisis, llamada hormona del crecimiento. Estas hormonas juegan un papel de transferencia de información en un sentido, pero difieren en muchas formas de las hormonas mencionadas anteriormente. La respuesta celular a estas hormonas es menos rápida que las otras, y los cambios que son producidos por ellas, pueden persistir por grandes períodos sin importar la concentración presente de la hormona. Ellas juegan un importante papel en la regulación del metabolismo y en ausencia prolongada de ellas, la célula puede ser incapaz de responder a otras hormonas. Consecuentemente han sido referidas como hormonas permisivas. Puesto que las células y tejidos, no se desarrollan apropiadamente en su ausencia, han sido llamadas también hormonas del desarrollo. Algunas veces es difícil distinguir estas hormonas en términos de su actividad biológica, de algunos otros compuestos biológicamente activos. La vitamina D, por ejemplo, la cual es parecida químicamente a las hormonas esteroidales, también se asemeja a estas hormonas en el tipo de efecto que produce. Estos efectos en todos los casos parecen involucrar una alteración en la síntesis de proteínas y en ningún caso se ha mostrado que impliquen un cambio inmediato en el ni-

vel del AMP cíclico. Si miramos las hormonas del primer grupo como primeros mensajeros químicos, entonces podemos decir que las hormonas de este segundo grupo son los ingenieros de mantenimiento. Habiendo bosquejado la distinción entre los tipos de hormonas en una forma ligera, debemos ensombrecerlo. La distinción no es siempre tan clara como nos gustaría a nosotros que generalmente nos apresuremos a clasificar cosas.

La Figura 5 nos muestra la organización del sistema endócrino de los mamíferos. La síntesis y/o liberación de varias hormonas está controlada en una forma muy organizada, involucrando tres estados sucesivos de interacciones célula-objetivo-hormona.

Cuando el hipotálamo en la base del cerebro, recibe mensajes nerviosos específicos, secreta pequeñas cantidades de hormonas llamadas factores liberadores, las cuales son enviadas a la glándula pituitaria anterior por medio de las venas porta. Aquí cada uno de los factores liberadores puede ocasionar la liberación de la hormona específica de la glándula pituitaria anterior.

Por ejemplo, el factor liberador de tirotropina (FLT) ocasiona la liberación de la hormona tirotrópica y el factor liberador de corticotropina causa la liberación de la hormona adrenocorticotrópica. El hipotálamo secreta también sustancias de tipo hormonal llamadas factores inhibitorios los cuales pueden inhibir la liberación de algunas de las hormonas pituitarias.

Las diversas hormonas liberadas de la pituitaria anterior (Figura 5), pasan vía el torrente sanguíneo a las glándulas objetivo específicas. El objetivo de la HACT es la corteza adrenal y el de la hormona tirotrópica es la glándula tiroidea. Esas glándulas, como aquellas otras glándulas de hormonas de la pituitaria anterior, particularmente características, las

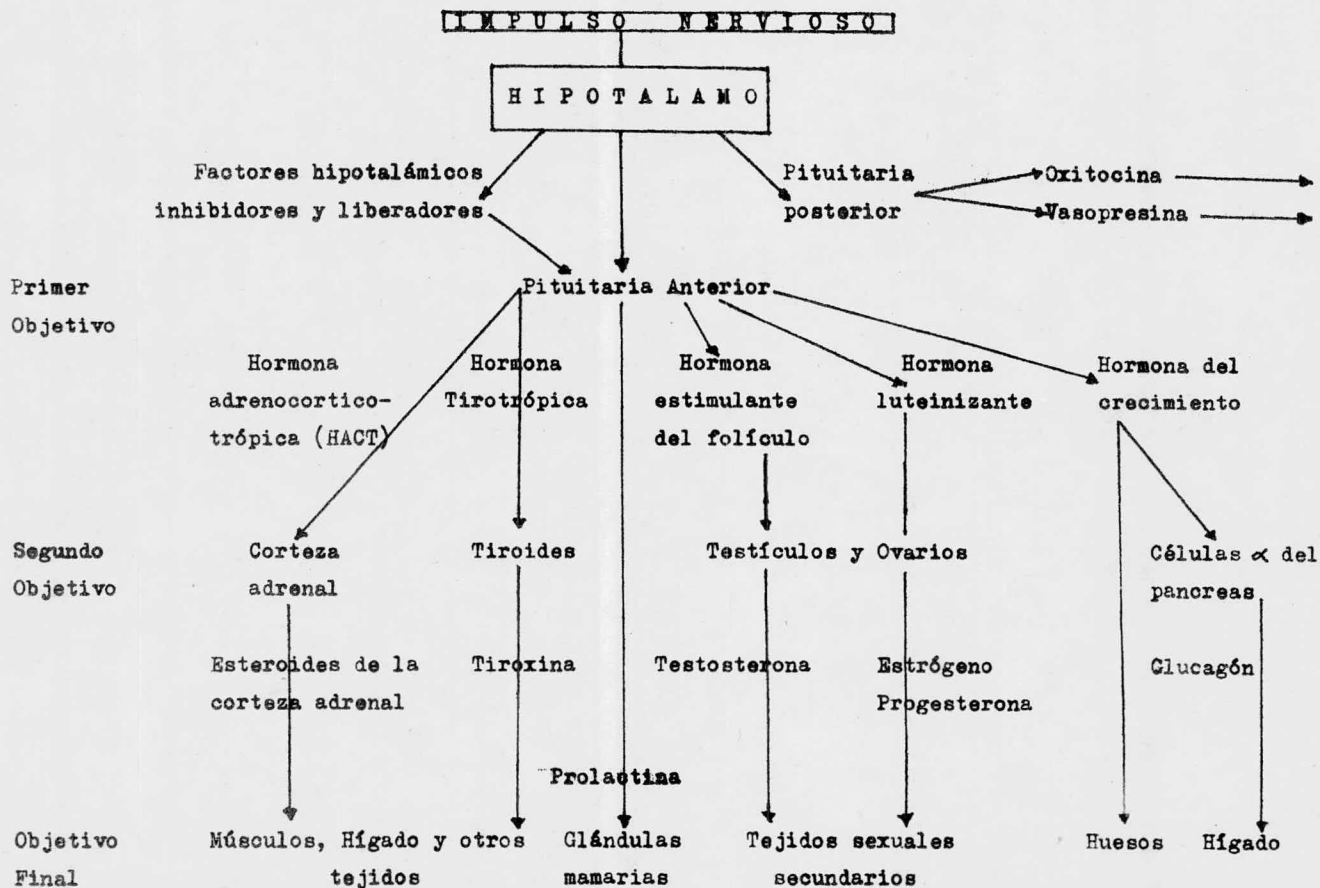


Figura 5.- Jerarquía de la regulación endócrina bajo el control del hipotálamo.

cuales actúan sobre algún tejido objetivo final como se muestra en dicha figura. El hipotálamo además de secretar diversos factores liberadores e inhibitorios que actúan sobre la pituitaria anterior, genera al menos otras dos hormonas, oxitocina y vasopresina u hormonas antidiuréticas las cuales son importantes en la regulación de lactación y en el balance de agua respectivamente. Estas hormonas, enlazadas a pequeñas proteínas llamadas neurofisinas, pasan a la pituitaria posterior de la cual son liberadas al torrente sanguíneo.

Las hormonas cuya liberación están bajo un control menos directo de la pituitaria incluye los polipéptidos calcitonina (formado por ciertos tipos de células en las glándulas tiroideas y paratiroides) y la hormona paratiroidea la cual regula el metabolismo de calcio y fósforo. Dentro de este grupo están también la insulina y glucagón, polipéptidos formados por las células α y β respectivamente en los islotes de Langerhans en la región endócrina del páncreas, así como también la epinefrina formadas por la médula adrenal. En adición a las hormonas especificadas aquí y en la figura anterior, se han encontrado otras más que controlan una gran variedad de actividades fisiológicas.

A pesar de que el sitio exacto en la acción de cualquiera hormona no ha sido bien establecido, se han propuesto cinco sitios generales (31):

A.- Inducción de síntesis enzimática a un nivel nuclear: muchas hormonas, particularmente las esteroidales, pueden actuar para estimular la producción de RNA en el núcleo de la célula objetivo y con ello incrementar la síntesis de enzimas específicas o grupos de enzimas catalizadoras de una vía metabólica. De tal forma, las hormonas pueden verse como modificadores de expresión genética. Por lo que no es de sorprendernos que tales hormonas cuando son marcadas isotópicamente se encuentren localizadas en el núcleo. Otra evidencia de su acción nuclear es la demostración de un incremento en la síntesis

sis de RNA medido por la incorporación de precursores marcados. Las hormonas esteroidales incrementan la síntesis del RNA total por el núcleo. Finalmente, el incremento de actividad de una enzima después de la administración de una hormona puede ser bloqueada por la adición de inhibidores de síntesis de RNA tales como la actinomicina-D, indicando que la acción hormonal sobre la actividad enzimática estaba regulada por un efecto sobre la síntesis del RNA.

B.- Estimulación de la síntesis enzimática a un nivel de la síntesis de proteínas: la actividad es a nivel de traducción de la información llevada por el RNA mensajero a los ribosomas para la producción de enzimas proteínicas.

C.- Activación directa a un nivel enzimático: ya que el efecto directo de una hormona sobre una enzima pura es difícil de demostrar, el tratamiento de animales intactos o de tejidos aislados con algunas hormonas, resulta en un cambio de actividad enzimática sin afectar el producto de la síntesis.

D.- Acción hormonal a nivel membrana: muchas hormonas parecen estar involucradas en el transporte de varias sustancias a través de la membrana celular. Por lo general, estas hormonas se unen a ciertas membranas celulares específicas.

E.- Acción hormonal en relación a nivel de nucleótidos cíclicos: el AMP cíclico juega un papel único en la acción de muchas hormonas. Su nivel puede ser incrementado o disminuido por la acción hormonal y su efecto varía dependiendo del tejido. Así podemos agrupar las hormonas que utilizan al AMP cíclico como un segundo mensajero según la tabla siguiente (32).

T A B L A I

RELACION ENTRE LAS ACCIONES -
METABOLICAS DE LAS HORMONAS Y -
CAMBIOS EN EL AMP CICLICO.

Hormona	Tejido	Efecto
Acciones incrementando el nivel de AMP cíclico		
Hormona adrenocor ticotrópica (HACT)	Corteza adrenal graso	Esteroidogénesis lipólisis
Luteinizante (HL)	cuerpo lúteo, ovario, testis graso	esteroidogénesis lipólisis
Catecolaminas	hepático graso músculo esque - lético corazón glándulas sali - vales útero	glicogenólisis, gluco neogénesis lipólisis glicogenólisis efecto inotrópico secreción de amilasa relajamiento
Glucagón	hepático graso células pan - creáticas corazón	glicogenólisis, gluco neogénesis, induc - ción de enzimas, ce - togénesis, lipólisis liberación de insuli na efecto inotrópico
Hormona estimulan te del tiroides - (HET)	tiroides	liberación de la - hormona tiroides - activa la fosforila-

		sa.
Hormona estimulante del melanocito	piel de rana	oscurecimiento.
Hormona paratiroidea	riñón	fosfaturia, reabsorción
	óseo	reabsorción de calcio
Vasopresina	vejiga de rana	permeabilidad.
Factores hipotalámicos liberados	adenohipófisis	liberación de hormonas tróficas.
Prostaglandinas	plaquetas tiroides	agregación liberación hormona-tiroidea
	adenohipófisis	liberación de hormonas tróficas.

Acciones que disminuyen el nivel de AMP cíclico.

Insulina	graso hepático	lipólisis glicogenólisis gluconeogénesis
Prostaglandinas	graso vejiga de rana	lipólisis permeabilidad
Catecolaminas (estímulos-adrenérgicos)	páncreas piel de rana plaquetas	liberación de insulina. oscurecimiento. agregación.

Melatonina

piel de rana

obscuraci -
miento.

Como veremos el AMP cíclico es también un mediador específico o mensajero en otros tipos de sistema regulatorios de la célula (33). Regula la síntesis inducida de enzimas, participa en la transmisión sináptica en el sistema nervioso, participa en la regulación de la división celular y es un mediador en las reacciones inflamatorias e inmunes de los tejidos, incluyendo alergias.

C A P I T U L O I I

P A P E L D E L A M P C I C L I
C O E N L A R E G U L A C I O N -
D E L A A C T I V I D A D E N Z I -
M A T I C A .

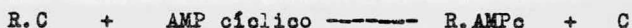
Esta función no ha quedado muy clara, teniéndose pocos -
ejemplos donde se ha podido elucidar su papel. Uno de estos -
mecanismos fué el que propició el descubrimiento del AMP cícli-
co, la glucogenólisis en el hígado.

El glucógeno es un compuesto almacenador de energía y su -
movilización constituye un proceso fisiológico muy importante.-
Estudios de la regulación de este proceso a un nivel hormonal -
y enzimático (Figura 6), han revelado un sistema complejo y -
elegante para la regulación de la actividad enzimática vía pro-
cesos de fosforilación.

En los tejidos animales los factores reguladores de las ve-
locidades de síntesis y de degradación del glucógeno se han es-
tudiado con gran detalle y se sabe que estos procesos están ba-
jo control endócrino y que resultan modificados cuando existen-
alteraciones hormonales. En los mamíferos la extirpación de -
determinadas glándulas endócrinas o la administración de sus -
respectivas secreciones, provoca cambios característicos en el-
metabolismo de los carbohidratos; este es el caso con la hormo-
na del crecimiento de la pituitaria anterior, con la insulina--
y el glucagón del páncreas, con los esteroides secretados por -
la corteza adrenal y con la epinefrina secretada por la médula-
de las adrenales. Estas hormonas actúan sobre distintos pun -
tos de las vías del metabolismo de la glucosa. Sin embargo, -
dos de ellas concretamente la epinefrina y el glucagón, ejercen
sus efectos característicos sobre las etapas enzimáticas que -

median entre el glucógeno y la glucosa-1-fosfato. Cuando se administra a mamíferos glucagón y epinefrina, se provoca un rápido declive del contenido en glucógeno del hígado y un aumento en la glucosa sanguínea. Este cambio es resultado de la estimulación de la actividad de la glucógeno fosforilasa y de la actividad de la glucógeno sintetasa.

La secuencia de fosforilación principia con la activación de una proteínaquinasa dependiente del AMP cíclico una enzima alostérica la cual es un receptor del AMP cíclico en varios tejidos y especies, siendo el responsable de algunos efectos del nucleótido. La proteína quinasa de diferentes fuentes se ha demostrado que consiste de una subunidad reguladora (R) que se une al AMP cíclico y una subunidad catalítica (C) independiente del AMP cíclico. Brostrom y colaboradores (33), propusieron la siguiente ecuación para explicar la acción del AMP cíclico sobre la proteína quinasa:



De acuerdo a esta ecuación las hormonas que alteran el nivel intracelular del AMP cíclico afectan la fracción de la proteína quinasa en la forma activa (C). Sin embargo, no se tiene la evidencia para este mecanismo en tejido intacto. Es importante hacer notar que en este proceso no se destruye el AMP cíclico.

La subunidad catalítica realiza la fosforilación de la forma inactiva de fosforilasa quinasa a expensas de ATP para dar fosforilasa quinasa activa. Cabe señalar que la proteína quinasa no es específica para la fosforilación de fosforilasa quinasa; puede fosforilar otras proteínas, tales como ciertas histonas, proteínas ribosomales, proteínas de lípidos en membrana celular, también proteínas de membrana mitocondrial-

microsomias y lisosomas. En todos los casos la proteina quina sa requiere de AMP cíclico para su actividad.

La fosforilasa quinasa es una enzima dependiente de Ca^{+2} que cataliza la fosforilación de residuos específicos de serina de la fosforilasa "b". Y la glucógeno fosforilasa se encuentra en dos formas: la activa (fosforilasa "a") y otra mucho menos activa (fosforilasa "b"). La fosforilasa "a" se ha cristalizado, posee un peso molecular de 380,000 y está constituida por cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad contiene un resto de fosfoserina, que es esencial para la actividad catalítica y una molécula de la coenzima fosfato de piridoxal que se halla unido covalentemente a un resto de lisina. La forma activa de la fosforilasa "a" puede ser atacada por otra enzima, la fosforilasa fosfatasa que hidroliza los grupos fosfato de los restos de fosfato de serina. Esta reacción da lugar a que la fosforilasa "a" se disocie en dos moléculas de fosforilasa "b" que es la forma menos activa. La fosforilasa "b" se reconvierte en moléculas activas de fosforilasa "a" mediante la fosforilación con cuatro moléculas de ATP que actúan sobre las moléculas de fosforilasa "b" en presencia de la enzima fosforilasa quinasa señalada anteriormente. La glucosa 1-fosfato es el producto final de la reacción de la fosforilasa del glucógeno.

La fosforilasa quinasa y la glucógeno sintetasa son ambas fosforiladas por la proteina quinasa (C). Esto resulta en la inactivación de glucógeno sintetasa y la activación de la fosforilasa quinasa; ésta última fosforila y activa la fosforilasa "b".

La importancia de este mecanismo consiste en que describe la secuencia de eventos moleculares como consecuencia de interacciones hormona-célula para la activación de procesos

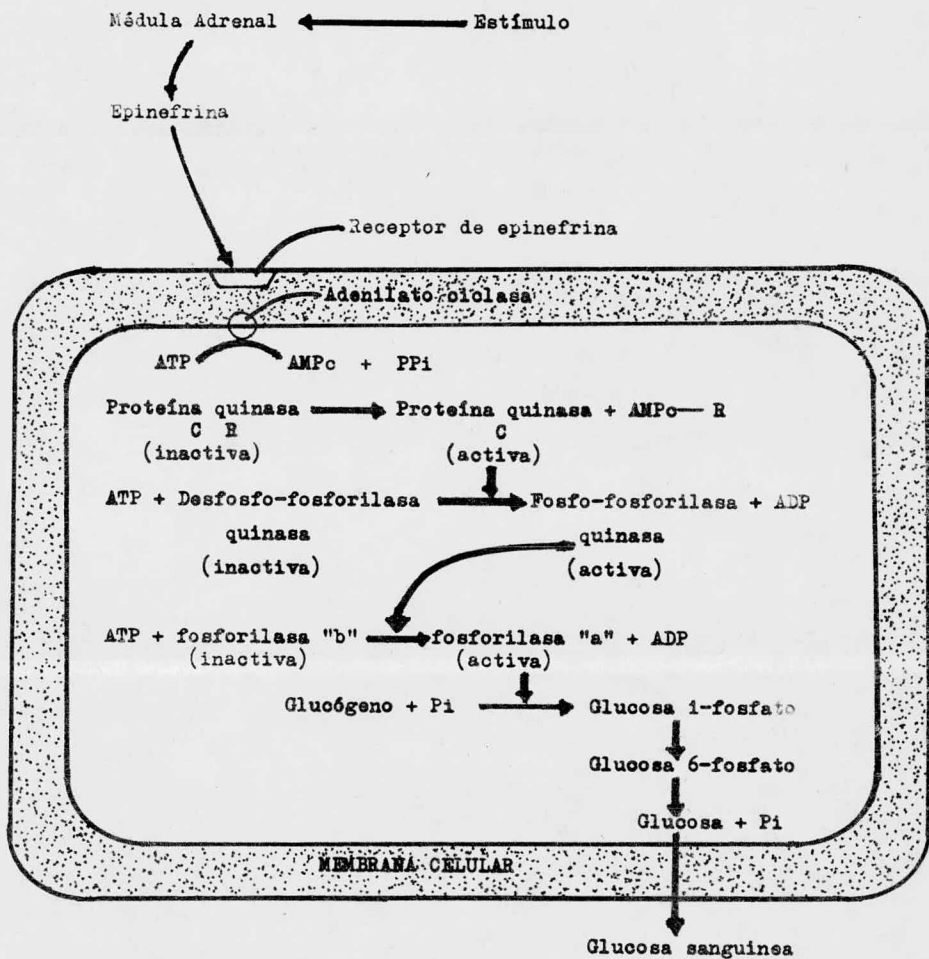


Figura 6. Activación de la fosforilasa en células hepáticas.

fisiológicos, lo cual ha llevado a realizar extensos estudios en reacciones de fosforilación.

Varias enzimas son fosforiladas, sin embargo, el análisis se limitará a las enzimas del metabolismo de glucógeno y lípidos por su íntima relación como materiales de almacenamiento de energía (34).

Una característica importante del sistema de fosforilación en el metabolismo del glucógeno es la coordinación entre la activación de la fosforólisis del glucógeno y la inactivación de la síntesis del mismo. Esto se deduce de la relación inversa de actividad y estado de fosforilación para la fosforilasa y la glucógeno sintetasa (Tabla II).

El control del metabolismo de lípidos puede también regularse mediante un sistema de enzimas fosforiladas. En el tejido adiposo triglicérido lipasa (Lipasa sensible a hormona), la enzima limitante de la velocidad en la lipólisis es activada por una proteína quinasa dependiente de AMP cíclico y es otra enzima que puede considerarse controlada por una fosforilación inducida hormonalmente. El complejo ácido graso sintetasa puede aislarse en una forma fosforilada (forma inactiva) y en una forma desfosforilada (activa), las cuales pueden ser interconvertidas in vitro. La fosforilación de la Acetil CoA carboxilasa, una enzima limitante de la velocidad en el camino de la síntesis de ácidos grasos, ha sido reportada in vitro. Se ve que una relación actividad-estado de fosforilación puede ser sugerida para las enzimas del metabolismo de lípidos como ha sido mostrado para enzimas del metabolismo del glucógeno (Tabla II). En otras palabras, la fosforilación podría favorecer la activación de las reacciones catabólicas y la inactivación de reacciones anabólicas.

T A B L A II.

RELACION ACTIVIDAD-ESTADO DE
LAS ENZIMAS DEL METABOLISMO -
DE GLUCOGENO Y LIPIDOS .

ENZIMA	FOSFORILADA	DESFOSFORILADA
<u>Catabólicas</u>		
Fosforilasa quinasa°	↑	↓
Fosforilasa	↑	↓
Lipasa sensible hormona°	↑	↓
<u>Anabólicas</u>		
Glucógeno sintetasa°	↓	↑
Acidos grasos sintetasa	↓	↑
Acetil CoA carboxilasa	↓	↑

°Está demostrado que son fosforiladas por la proteína qui -
nasa dependiente del AMP cíclico, la flecha hacia arriba indica -
la forma activa de la enzima y viceversa.

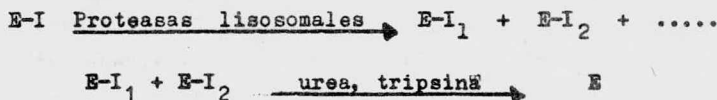
En contraste a nuestro conocimiento bien cimentado de las enzimas fosforilantes y su papel en la activación de glucogé-lisis, las proteínas fosfatasas, las cuales ejecutan el proceso contrario de fosforilación, están siendo estudiadas respecto de sus propiedades y su función en el centro del metabolismo del glucógeno. Se han planteado dos preguntas principalmente. La primera es, si las reacciones para desfosforilar son - llevadas a cabo por enzimas fosfatasas diferentes. Para el metabolismo del glucógeno, esto podría involucrar al menos tres - enzimas llamadas glucógeno sintetasa fosfatasa, fosforilasa - quinasa fosfatasa y fosforilasa fosfatasa. La segunda pregunta es cómo se controlan las desfosforilaciones.

Estudios recientes indican que una enzima sencilla interviene en los tres procesos de desfosforilación es decir, las - actividades señaladas a las enzimas anteriores se basarían en la misma molécula protéica. Estudios con preparaciones de pro-teína fosfatasa han proporcionado evidencias de especificidad-múltiple. Un problema de interpretación se origina del hecho de que se han reportado formas múltiples de la enzima de diver-sos pesos moleculares generalmente mayores que el peso molecu-lar de 35,000 encontrado para fosforilasa fosfatasa purifica-da. Esto origina la posibilidad de formas enzimáticas múlti-ples teniendo especificidades similares o complementarias. -
Mientras que la evidencia es muy clara para la existencia de -enzimas de especificidad múltiple, la evidencia de que una pro-teína fosfatasa sencilla regule el proceso para desfosforilar-oponiéndose a una proteína quinasa está incompleta. Sin em-bargo, existen especulaciones para este último objetivo, pues-to que el descubrimiento de un posible mecanismo para la regu-lación de la actividad de la proteína fosfatasa ha proporciona-do una explicación aceptable para la existencia de formas enzi-máticas múltiples involucrando una subunidad catalítica sencilla. Diversos tratamientos de la fosfatasa, tales como expo-

sición a tripsina, a elevadas concentraciones de etanol o urea-- o el congelamiento en mercaptoetanol 0.2M llevaron a la activa-- ción y/o reducción del peso molecular de la proteína fosfatasa.-

Se sugiere la existencia de formas inactivas o menos acti-- vas de la enzima consistiendo de complejos enzima-inhibidores en la cual una subunidad catalítica única (35,000 P. M.) es acom - plejada por proteínas inhibidoras. La explicación para el fenó-- meno activación-disociación es la asombrosa estabilidad de la - subunidad catalítica en condiciones que causan la destrucción - o remoción de los inhibidores. Una base adicional para esta hi-- pótesis se encontró en la demostración con proteínas inhibidoras estables al calor uniéndose a fosforilasa fosfatasa hepática pa-- ra regenerar complejos menos activos y de elevado peso molecu - lar.

Recientemente se ha preguntado el origen de las múltiples - formas enzimáticas en extractos de hígado y se han obtenido - pruebas de que son productos de una proteólisis parcial durante - la homogenización hepática. Entonces, si la fosfatasa es exami-- nada en extractos preparados bajo condiciones en las cuales se - reduzca la hidrólisis lisosomal, únicamente una forma sencilla - inactiva de alto peso molecular está presente. Parece razonable - proponer que la existencia de formas múltiples y de activación - pueden ser acomodadas en la siguiente secuencia:



En esta secuencia E-I es el complejo enzima-inhibidor el - cual es inactivo o menos activo. E es una subunidad catalítica de peso molecular 35,000, I es una proteína inhibidora específica, mientras que E-I₁, E-I₂, representan una familia de comple - jos generados por proteólisis parcial de la proteína individual.

Mientras que la interconversión de la fosfatasa entre sus formas activa e inactiva no se ha visto in vivo, la proposición de que la proteína fosfatasa existe en una forma inactiva con sistente de un complejo enzima-inhibidor tiene importantes im - plicaciones para la posible regulación de la actividad enzimáti ca. Un modelo especulativo de esta regulación se muestra en - la Figura 7. Se propone que el guanosín 3', 5'-monofosfato - (GMP cíclico) interacciona con el inhibidor del complejo resul - tando en su disociación con la consecuente activación de la fos fatasa. Este es esencialmente el mismo mecanismo por el cual - la proteína quinasa es regulada.

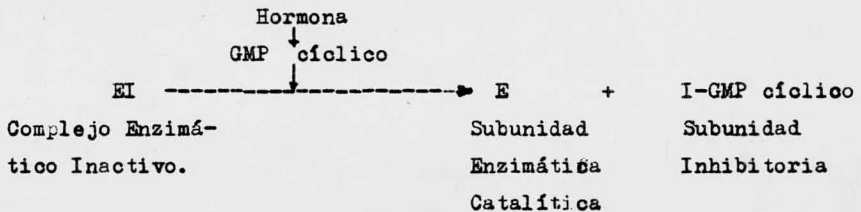


FIGURA 7.- Mecanismo propuesto para la regulación de la proteína fosfatasa

Como habíamos notado (Tabla II), la coordinación en la acti vación de la degradación del glucógeno y la inhibición de su sín tesis, es inherente a la relación actividad-estado de fosforila - ción de las enzimas involucradas. Esto es cierto también en + las reacciones para desfosforilar; pero en este caso el proceso - de síntesis se activa y el de degradación se inactiva. Mientras que la posibilidad de un control por fosforilación de proteínas - en el metabolismo de lípidos descrito en la Tabla II es aún espe culativo, la desfosforilación de proteínas en este sistema favo - recerá el anabolismo. Dadas las relaciones mostradas en la - Tabla II y el desarrollo de pruebas para un control unitario - por una proteína fosfatasa sencilla parece inevitable que ésta, - se encontrará que está bajo regulación hormonal.

Está bien establecido que la insulina estimula la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas; pero las bases moleculares de estas acciones se desconocen. Los efectos sobre el anabolismo de glucógeno y lípidos seguirían de la desfosforilación de las enzimas mostradas en la Tabla II. Se han propuesto mecanismos que involucran un decremento en la actividad de la proteína quinasa o en los niveles de AMP cíclico. Por lo que es igualmente razonable pensar que la insulina activa las fosfatasa y que estas enzimas sean el objetivo de la acción de la insulina, basado en el incremento de actividades de la glucógeno sintetasa fosfatasa en el hígado y de la proteína fosfatasa en tejido adiposo debido a la insulina.

Proponiendo que la proteína fosfatasa es una enzima objetivo para la regulación de los efectos de insulina, en términos del modelo de la Figura 7, la insulina causaría la formación del segundo mensajero (GMP cíclico). Los efectos opuestos de hormonas tales como epinefrina e insulina podrían ser explicados en base al control de dos sistemas enzimáticos opuestos los cuales se presentan en la Figura 8.

En síntesis, el AMP cíclico actúa como un acelerador del metabolismo en tanto que el GMP cíclico actúa como un freno del mismo. Estos efectos se pueden observar in vivo, siempre que se agreguen los factores AMP cíclico y GMP cíclico que proceden de la actividad de enzimas membranales o sea que estos nucleótidos sirven como un medio químico de comunicación entre la membrana y el citoplasma.

Los efectos conocidos (35) de AMP cíclico se presentan en la Tabla III. Esa tabla incluye efectos que han sido observados a todo nivel de organización, desde enzimas relativamente puras hasta el nivel de fragmentos de tejidos en los cuales pueden verse razonablemente los efectos directos del nucleótido.

GLUCOGENOLISIS

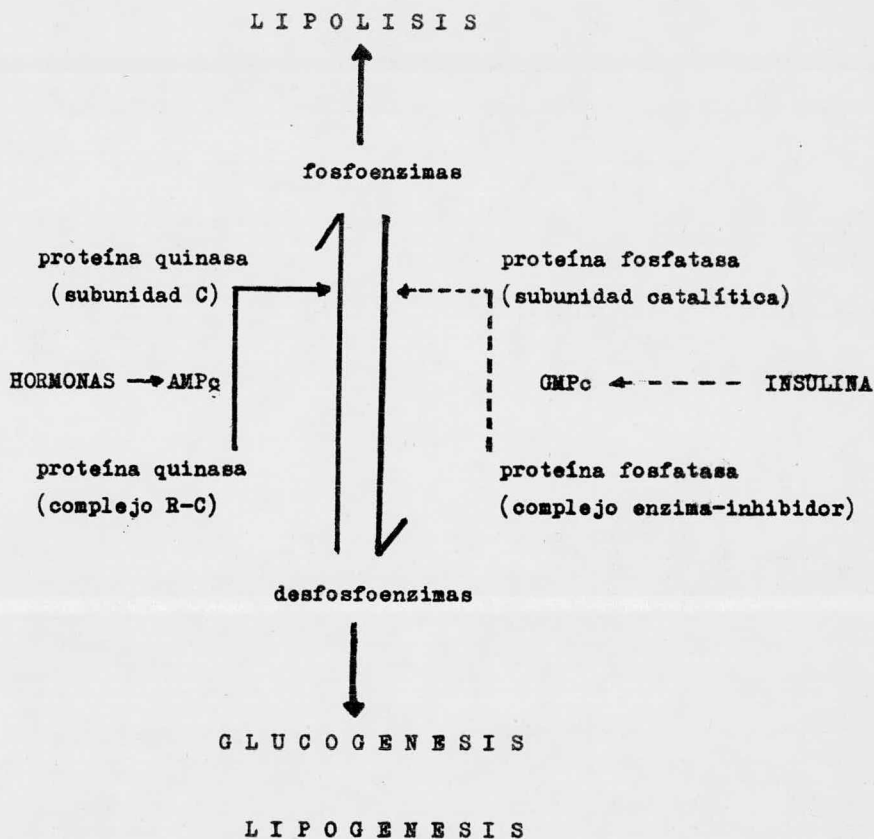


Figura 8. Una especulación acerca de la integración en los controles de procesos catabólicos y anabólicos en metabolismo de lípidos y glucógeno por medio de reacciones de fosforilación y desfosforilación.

T A B L A III

EFECTOS CONOCIDOS DEL AMP -
CICLICO.

ENZIMA O PROCESO AFECTADO	TEJIDO	CAMBIO EN ACTIVIDAD O VELOCIDAD
Proteína quinasa	Varios	Incrementa
Fosforilasa quinasa	Músculo	Incrementa
Inactivación fosforilasa fosfatasa	Adrenal	Incrementa
Activación fosforilasa	Varios	Incrementa
Glucógeno sintetasa quinasa	Músculo	Incrementa
	Hígado	Incrementa
Inactivación glucógeno sin- tetasa	Músculo	Incrementa
Activación fosfofructo qui- nasa	F. hepática	Incrementa
Inactivación fructuosa-1,6 difosfatasa	Riñón	Incrementa
Inducción tirosina trans - aminasa	Hígado	Incrementa
Inducción glucosa-6-fosfa- tasa	Hígado	Incrementa
Inducción serina <u>dehidrata</u> sa	Hígado	Incrementa
Inducción B-galactosidasa	E. coli	Incrementa
Piruvato quinasa	Embrión de lobo	Incrementa
Glucogenólisis	Hígado	Incrementa
Gluconeogénesis	Hígado	Incrementa
Formación urea	Hígado	Incrementa
Cetogénesis	Hígado	Incrementa
Difusión K	Hígado	Incrementa
Difusión Ca	Hígado	Incrementa

Lipogénesis	Hígado	Decrementa
Permeabilidad	Vejiga de rana	Incrementa
Reabsorción Ca	Huesos	Incrementa
Permeabilidad	Intestino, riñón	Incrementa
Producción renina	Riñón	Incrementa
Aminoácido--proteína	Hígado	Decrementa
Lipólisis	Adiposo	Incrementa
Esteroidogénesis	Varios	Incrementa
Consumo de oxígeno	Adiposo	Incrementa
Deshidrogenasa-6-fosfo gluconato	Adiposo	Decrementa
Liberación amilasa	Parótido	Incrementa
Liberación insulina	Páncreas	Incrementa
Liberación HACT	Pituitaria an- terior	Incrementa
Liberación HTS	Pituitaria an- terior	Incrementa
Liberación HG	Pituitaria an- terior	Incrementa
Liberación hormona ti- roides.	Tiroideo	Incrementa
Liberación calcitonina	Tiroideo	Incrementa
Liberación histamina	Leucocitos	Decrementa
Secreción HCl	Mucosa gástrica	Incrementa
Secreción de fluidos	Insectos	Incrementa
Relajación	Músculo liso	Incrementa
Fuerza de contracción	Músculo cardíaco	Incrementa
Agregación	Plaquetas	Decrementa
Desinhibición fosfo - fructo quinasa	Varios	Incrementa
Liberación de proteínas a partir de polisomas	Hígado	Incrementa
Síntesis Lac RNAM	E. coli	Incrementa
Síntesis DNA	Timocitos	Incrementa
Formación de flagelos	E. coli	Incrementa

Melanositogénesis	Escamas	Incrementa
Luteinización	Células granulo sas	Incrementa
Velocidad de contracción	Músculo cardíaco	Incrementa
Membrana potencial	Músculo liso	Incrementa

C A P I T U L O I I I

E F E C T O T R A N S C R I P C I O N A L -
D E L A M P C I C L I C O

En muchas bacterias la síntesis de enzimas inducibles - requiere de este nucleótido (36). E. coli contiene la información genética para la síntesis de enzimas necesarias que - utilizan diversas sustancias como fuente de carbón y energía. Ordinariamente, esta información genética no es expresada sino que los organismos únicamente sintetizan las enzimas requeridas para la utilización de un compuesto en particular cuando éste se encuentre presente en el medio. Por ejemplo, se - requieren dos proteínas para la utilización de lactosa: una - galactosidasa permeasa, la cual permite la entrada de lacto - sa a la célula y la B-galactosidasa, la cual cataliza la hi - drólisis de lactosa a glucosa y galactosa (37). Una tercera - proteína tiogalactósida transacetilasa, se sintetiza junto - con las otras dos; su papel en el metabolismo de la lactosa - es desconocido. La adición de lactosa o un análogo de la lac - tosa no metabolizable tal como el isopropiltio B-D-galactósi - do (IPTG) a un cultivo de E. coli induce la síntesis de gran - des cantidades de estas tres proteínas; en la ausencia del in - ductor tales enzimas están presentes únicamente en pequeñas - cantidades. Similarmente, otras fuentes potenciales de carbono inducen enzimas requeridas para su metabolismo.

La presencia o ausencia de inductores no es el único fac - tor que regula la síntesis de enzimas inducidas. Aún en pre - sencia de lactosa o IPTG, la velocidad diferencial de sínte - sis de la B-galactosidasa (la velocidad de la enzima dividi - da por la velocidad de síntesis protéica total) puede variar - grandemente, dependiendo del medio en el cual las células es - tán creciendo. Esta velocidad diferencial se eleva en culti -

vos donde el succinato es una fuente de carbón, en el cual el crecimiento es lento y baja cuando se utilizan en fuentes de carbón tales como la glucosa, donde el crecimiento es rápido. La represión sobre la síntesis de enzimas inducibles por glucosa se conoce desde hace muchos años y fué llamada originalmente "el efecto glucosa" (38). Recientemente se ha encontrado que otras fuentes de carbón causan una represión similar por lo que se emplean nuevos nombres tales como "represión metabólica" o "represión catabólica" para describir este fenómeno (39).

En 1965 Makman y Sutherland (40) reportaron que *E. coli* contenía el nucleótido cíclico adenosín 3', 5'-monofosfato y que la glucosa bajaba la concentración de AMP cíclico en estos organismos. Por lo que si el AMP cíclico tiene un importante papel regulador en células de animales, era de suponerse que pudiera tener un papel no menos importante en bacterias. Por lo que se postuló que la represión de la síntesis enzimática por glucosa y otras fuentes de carbono se debían al abatimiento de las concentraciones de AMP cíclico a cultivos en los cuales la síntesis de B-galactosidasa estaba reprimida por glucosa u otros carbohidratos. Esta represión se superaba ampliamente y se incrementaba la síntesis enzimática en células crecidas en succinato. El efecto resultó específico para AMP cíclico. Otros nucleótidos de la adenina tales como adenosín trifosfato (ATP), adenosín difosfato (ADP), 5'-AMP y 3'-AMP y además análogos del AMP cíclico incluyendo 2'-desoxi AMP cíclico, N,O-dibutiril AMP cíclico, N-monobutiril AMP cíclico y guanosín 3', 5'-monofosfato fueron ineficaces (41).

La glucosa reprime la síntesis de un buen número de enzimas inducibles y proteínas de transporte además de la B-galactosidasa. Se estudiaron los efectos del AMP cíclico sobre la síntesis de muchas de éstas y en cada caso el AMP cíclico estimuló la síntesis de enzimas en cultivos reprimidos por gluco -

sa (42).

Los mecanismos por los cuales el AMP cíclico estimula la síntesis de enzimas inducibles han sido estudiados para dos enzimas: B-galactosidasa y triptofanasa. (43,44) . Con respecto a la estimulación de la síntesis de B-galactosidasa por el AMP-cíclico han surgido dos preguntas. 1.- ¿El AMP cíclico estimula la síntesis del RNA-mensajero para la B-galactosidasa o incrementa la traducción de este RNA en proteína enzimática? 2.- ¿Se requiere un sitio cromosomal en el operón-Lac para la acción del AMP cíclico?. Nakada y Magasanik (45), estimaron la concentración de Lac RNA-mensajero por la capacidad de las células para sintetizar B-galactosidasa después de separar el inductor y mostraron que bajo ciertas condiciones, la glucosa abataba las concentraciones de este RNA-mensajero. En experimentos similares el AMP cíclico incrementaba la cantidad de RNA-Lac en cultivos reprimidos por glucosa (46). Posteriormente se realizaron otros estudios (47), llegando a la conclusión de que el AMP cíclico estimula la iniciación de la síntesis de RNAm-Lac, lo cual concuerda con la respuesta a la segunda pregunta acerca del sitio cromosomal a través del cual se ejerce el efecto del AMP cíclico. La Figura 9 muestra el operón-Lac, los tres genes estructurales del operón "z", "y", "a" los cuales codifican para la síntesis de B-galactosidasa permeasa y tiogalactosidasa transacetilasa, respectivamente; "i", "p" y "o" son los genes reguladores del operón. El gene "i" codifica para una proteína represora la cual se une al DNA de la región-operadora (o), con lo cual previene la transcripción del RNAm para la síntesis de la lactosa. Inductores tales como IPTG,-- estimulan la síntesis de RNAm-Lac enlazándose al represor y reduciendo su afinidad por el operador. Los genes mutantes "i" y "o" sintetizan principalmente las proteínas constitutivas del Lac (en ausencia de inductores), ya que las mutaciones decrementan la dificultad de enlazamiento represor-operador. El promo-

tor o gene "p" controla la velocidad máxima del operón-Lac. Las mutantes de promotores responden a sustancias inductoras; sólo-después de proporcionarles grandes cantidades del compuesto inductor y sintetizan tan sólo un porcentaje ligeramente mayor de proteínas que las que realizan los tipos normales o "salvajes".- Debido a esto se ha propuesto que el promotor es el sitio en el cual la RNA polimerasa se une al DNA Lac y es el sitio en el -- cual se inicia la síntesis del RNAm-Lac.

Pastan y Perlman (48), han estudiado el efecto del AMP cíclico en mutantes defectivas de los tres genes reguladores. La síntesis de B-galactosidasa en las mutantes de los genes "i" y "o" fué reprimida normalmente por glucosa y respondieron igualmente al AMP cíclico. Una mutante que carecía del gene "p" y parte del "i" no dió respuesta al AMP cíclico. Otra colonia la cual contenía una mutación puntual en el promotor Lac, manifestó un decremento en su sensibilidad al AMP cíclico.

La conclusión de que la acción del AMP cíclico requiere un sitio en el promotor sugiere que tiene el papel de facilitar la iniciación de la síntesis del Lac RNAm.

Como se mencionó anteriormente, mutantes deficientes en adenilato ciclasa son incapaces de utilizar una variedad de fuentes de carbón para su crecimiento; pues bien, existe un segundo tipo de mutantes las cuales tienen un fenotipo similar pero no contiene concentraciones normales o elevadas de adenil ciclasa. Parece que tales mutantes son anormalmente escasas en una proteína o proteínas con la cual el AMP cíclico podría interaccionar para producir su efecto. En un intento para aislar este receptor hipotético de AMP cíclico se investigó en células normales ejemplo E. coli, una proteína con elevada afinidad por el AMP cíclico (49). Se encontró y purificó dicha proteína. Dos mutantes pleotrópicas tienen proteínas con una baja afinidad por AMP cíclico sugiriendo que la proteína modificada que une al AMP cíclico cau

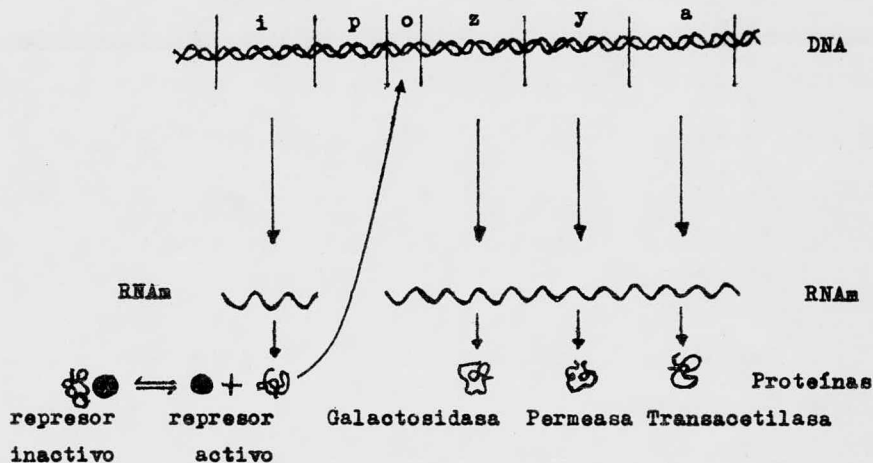
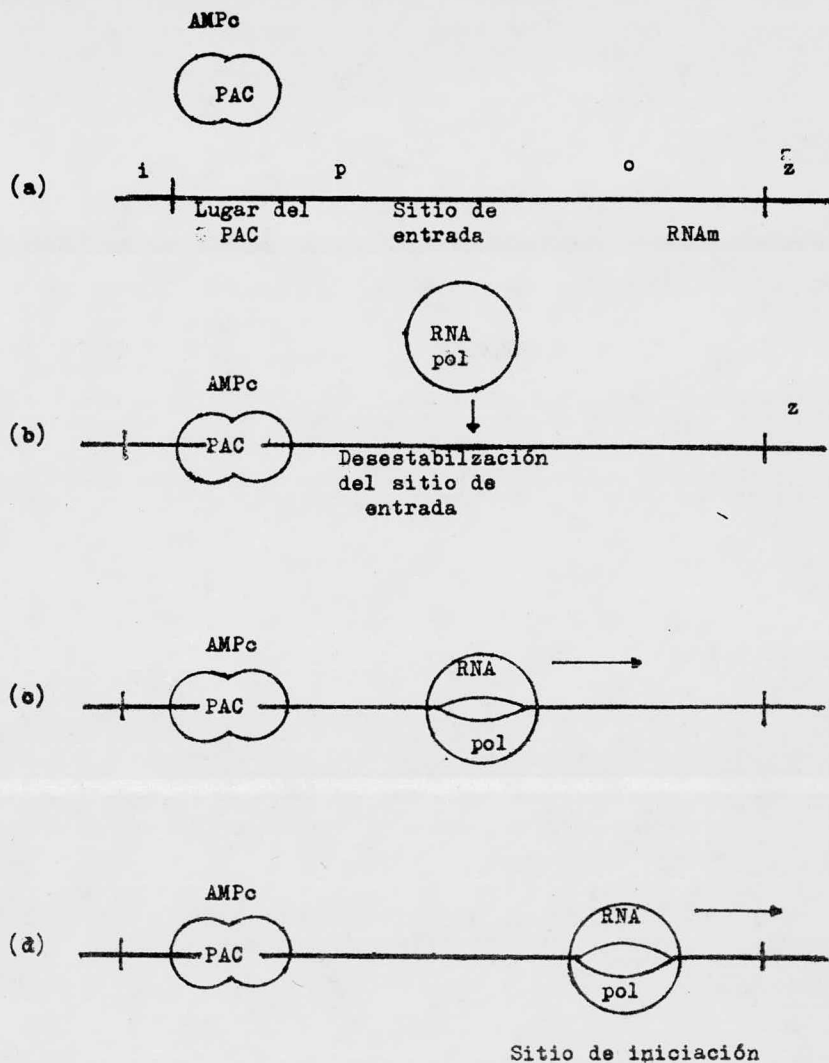


Figura 9. Representación esquemática del operón Lac y su -
 regulación coordinada. En la ausencia del inductor, (●), el repre
 sor codificado por el gene *i*, se une al operador (*o*) impidiendo -
 la transcripción de los genes estructurales *z*, *y* y *a* para B-galac-
 tosidasasa, permeasa y transacetilasa, respectivamente. Cuando la -
 molécula inductora está presente, se une al represor cambiando su
 conformación a una forma inactiva incapaz de unirse al gene opera
 dor. Los genes estructurales están libres para ser transcritos y
 producir un RNA mensajero policistrónico, el cual es traducido -
 por ribosomas para producir las tres proteínas. El segmento del -
 genoma marcado con *p* es el gene promotor.



Modelo para la iniciación de la transcripción del operón Lac (50). Después de que el complejo AMP cíclico-Proteína activadora del gen catabolito (PAC), se une a su sitio específico (a), el cual desestabiliza al DNA (b), la RNA polimerasa se liga en su sitio - (c) y es conducida englobada a su sitio de iniciación.

sa el fenotipo pleotrópico. Extractos libres de células de estas mutantes pleotrópicas resultan incapaces de sintetizar B-ga lactosidasa in vitro. La síntesis enzimática de estos extractos se estimuló por la adición de cantidades sucesivas de proteína enlazante de AMP cíclico pura. La proteína es inactiva en la ausencia de AMP cíclico y no estimula la síntesis enzimática en extractos de células normales. A esta proteína se le llamó proteína receptora de AMP cíclico (CRP) o proteína activadora del gene catabólico (PAC), la cual tiene un peso molecular de 45,000. Cuando el AMP cíclico y la PAC son adicionados conjuntamente a una mezcla de DNA lac, RNA polimerasa y los cuatro nucleótidos precursores NTP, se origina un marcado incremento en la velocidad de transcripción del DNA lac por RNA polimerasa; pero basta con que se omita AMP cíclico o PAC para que la transcripción disminuya. Recientemente (50), se ha logrado establecer que la proteína activadora (CAP) se une a un sitio vecino a la RNA polimerasa y permite la iniciación de la transcripción o sea que ejerce un control transcripcional positivo adicional en ciertas zonas genéticas de acuerdo con el modelo de Jacob y Monod (51).

Confirmada la hipótesis del papel transcripcional que desarrolla el AMP cíclico a un nivel bacteriano no debe sorprenderse de la versatilidad de funciones que desarrolla en organismos superiores, donde hasta hace poco se le consideraba como un simple mensajero en el caso de las hormonas y cuyos efectos eran tan sólo los de incrementar la fosforilación de enzimas, para con ello acelerar las respuestas de las células a estímulos externos. Así tenemos el caso de la hipótesis que se plantea para comprender el papel que desarrolla el AMP cíclico en la síntesis de esteroides, siendo a nuestro juicio superficial e incompleta, aunque de antemano sabemos de la complejidad de esta vía esteroideogénica.

D E E S T E R O I D E S . (3 5) .

Cuatro glándulas endócrinas, la corteza adrenal, las células testiculares intersticiales de Leydig, las células intersticiales del ovario y las células del cuerpo lúteo elaboran cantidades suficientes de hormonas esteroidales cuando son estimuladas por hormonas hipofisarias (Figura 10). Las hormonas esteroidales son sintetizadas a partir del colesterol por mecanismos similares. El paso limitante de la velocidad entre el colesterol y la hormona activa, es la conversión de colesterol a pregnenolona. En estos tejidos, la pregnenolona es convertida a progesterona y en la mayoría de los casos, pero no en todos, a 17-OH-progesterona. En la corteza adrenal, 17-OH-progesterona es (en cantidades pequeñas) convertida a testosterona y de ahí a estradiol 17B y otros estrógenos. En el testis, ovario y cuerpo lúteo, sin embargo, las 21 y 11-hidroxilasas están ausentes o en trazas. De ahí que en las células intersticiales del testis, la testosterona es el producto principal de la síntesis de hormonas esteroidales y el cual es secretado como tal. El ovario es algo más versátil ya que puede convertir la testosterona a estradiol-17B y otros estrógenos.

Se ve claramente que el AMP cíclico está involucrado en las acciones de la síntesis de esteroides de las hormonas trópicas- y también que el AMP cíclico está actuando al menos en parte para acelerar la conversión de colesterol a pregnenolona. Desafortunadamente, no se sabe cómo es que hace esto el AMP cíclico, debido a la complejidad de las reacciones involucradas y la dificultad de establecer sistemas libres de células en las cuales la síntesis de esteroides respondiera a HACT o AMP cíclico. (Lógico desde el punto de vista del mecanismo que se propone al final.

HIPOTESIS DE HAYNES-BERTHET: El AMP cíclico fué primeramente implicado en la esteroidogénesis por Haynes y Berthet quienes

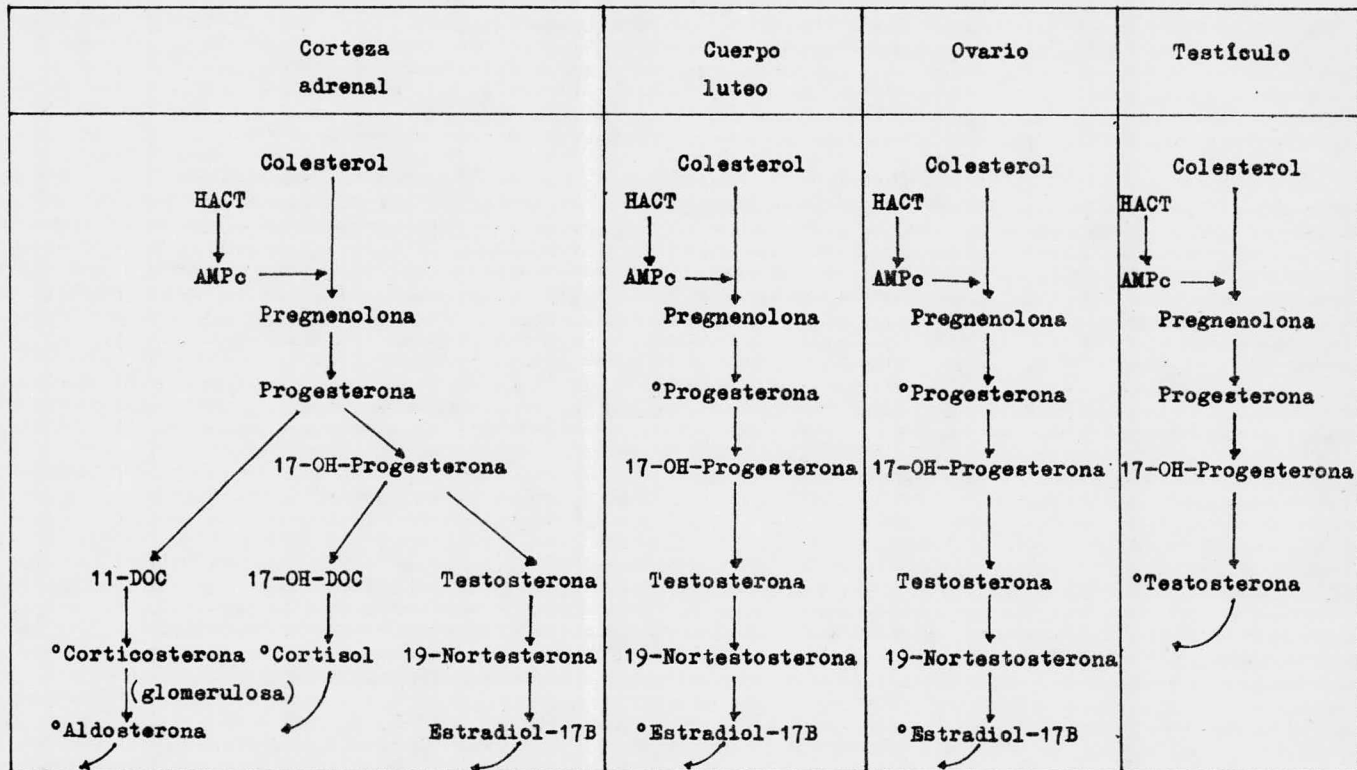


Figura 10. Síntesis de esteroides en la corteza adrenal y gónadas.

°Indica esteroides sintetizados y secretados en suficiente cantidad como para ser considerados como las principales hormonas esteroidales.

acumularon considerables datos indicando que la activación de la fosforilasa adrenal podía estar involucrada en la acción de HACT. Homogenados de corteza adrenal de res no produjeron esencialmente ninguna formación de corticosteroides a partir de precursores endógenos. Sin embargo, la adición de fumarato estimuló marcadamente la producción de corticosteroides, y la adición de NADP causó un incremento adicional. Otros habían mostrado que el NADP y el fumarato eran necesarios para la B-hidroxilación de esteroides y que el NADPH era el verdadero agente estimulante. Los hallazgos de Haynes con los homogenados sugirieron que el NADPH podía conducir la cadena completa de reacciones involucradas en la síntesis de esteroides. Puesto que se sabía que la corteza adrenal contenía las enzimas de la hexosa monofosfato relativa a las enzimas de glucólisis. Haynes razonó que la glucosa-6-fosfato en la corteza adrenal podría ser metabolizada primariamente por la ruta oxidativa, resultando en la generación de NADPH. Esta predicción fué basada en experimentos que mostraron la adición de glucosa-6-fosfato o glucosa-1-fosfato a homogenados estimulando la síntesis de esteroides en el mismo grado que el fumarato. Sin embargo, cuando se adicionó el glucógeno a los homogenados, la síntesis de esteroides no fué estimulada, sugiriendo que la fosforilasa era el paso limitante de la velocidad entre el glucógeno y la glucosa-6-fosfato en la corteza adrenal. La adición de glucógeno a homogenados fortalecidos con fosforilasa hepática purificada produjo una clara estimulación en la síntesis de esteroides. Posteriormente encontraron que rebanadas de corteza adrenal de res incubadas con HACT contenían niveles considerablemente más elevados de fosforilasa activa que los controles y que la especificidad cualitativa de la fosforilasa responde a HACT en forma exactamente semejante a la especificidad de la respuesta esteroideogénica de las rebanadas. Recíprocamente la HACT no estimuló la activación de la fosforilasa en homogenados hepáticos los cuales respondían a glucagón y epinefrina. Esta notable similitud entre las acciones de HACT sobre-

la fosforilasa hepática sugirieron que el AMP cíclico podría estar involucrado en la respuesta adrenal como se sabía que ocurría en el hígado.

Haynes encontró que fracciones particuladas de homogenados de la corteza adrenal de res estaban bien dotados de adenilato ciclasa y en suma, que los niveles de AMP cíclico en rebanadas adrenales incubadas con HACT eran superiores que aquellas rebanadas de control. La especificidad del AMP cíclico en respuesta al adrenal (como respuesta a la fosforilasa) semejaban la respuesta esteroideogénica en que hormonas como epinefrina y glucagón no tenían efecto sobre las concentraciones del AMP cíclico adrenal. Finalmente Haynes mostró que el AMP cíclico exógeno estimulaba la síntesis de esteroides en fragmentos adrenales de rata. Haynes reunió estos datos en una hipótesis para la acción de HACT la cual se ilustra en la Figura 11. La HACT activa la adenilato ciclasa y el ascenso resultante de AMP cíclico causa la activación de la fosforilasa. Como la fosforilasa es la enzima limitante en la velocidad de la trayectoria a glucosa-6-fosfato, la cantidad de glucosa-6-fosfato disponible por oxidación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se incrementa. Esto resultó en la generación de NADPH y es este incremento de NADPH lo que conducía la síntesis de esteroides incrementando las velocidades de las reacciones de hidroxilación. Sin embargo, esta hipótesis no ha podido comprobarse experimentalmente (al final de esta tesis se exponerá una hipótesis alternativa que salva hasta donde se conoce las dificultades experimentales de esta primera hipótesis).

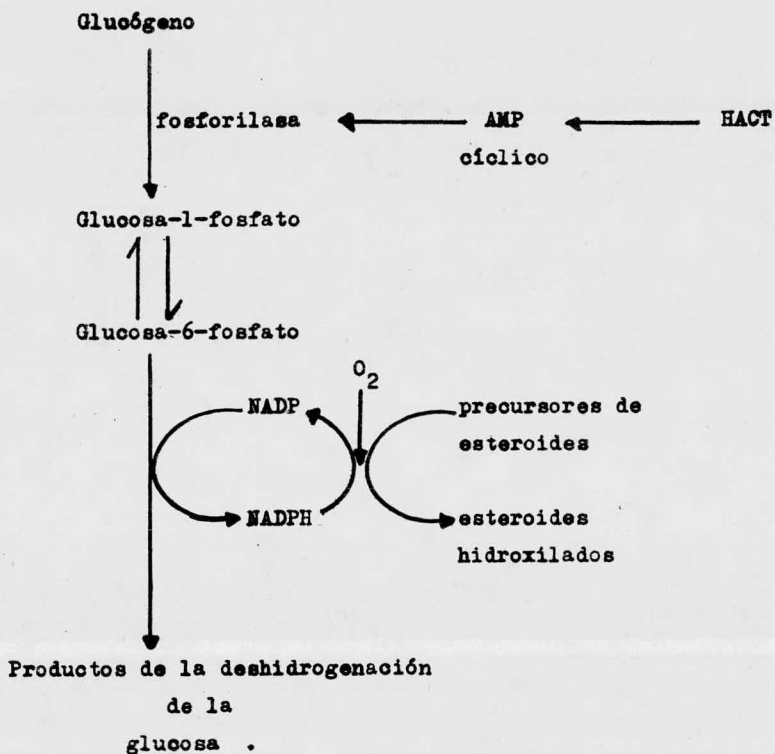


Figura 11. La hipótesis de Haynes (35).

C A P I T U L O I V

H I P O T E S I S D E L M E C A N I S M O
M O D E A C C I O N D E L A M P c.

Como resultado del análisis bibliográfico practicado acerca de las publicaciones aparecidas con respecto al AMP cíclico nos hemos dado cuenta de la evolución que ha sufrido la investigación en torno de este nucleótido. Dentro de esta monografía se ha señalado la importancia del papel que desempeña el AMP cíclico como Segundo Mensajero y como factor transcripcional. Y es precisamente esta función la que deseamos subrayar, pues es aquí donde podemos encontrar una explicación a ciertas funciones que no han sido cabalmente explicadas.

Tomando en consideración la versatilidad de funciones que desarrolla el AMP cíclico cabe proponer un mecanismo que de acuerdo a las siguientes bases nos permita comprender y explicar de una manera sencilla los alcances de este nucleótido dentro del funcionamiento celular.

Así tenemos que el AMP cíclico desempeña un papel primordial en la síntesis de proteínas enzimáticas en microorganismos tales como se mencionan a continuación (52)

Proteína	Organismo
Proteínas codificadas para el operón Lac	<u>E. coli</u>
Proteínas codificadas para el operón Gal	<u>E. Coli</u>
Proteínas codificadas para el operón Ara	<u>E. Coli</u>
Triptofanasa	<u>E. Coli</u>
D-serina deaminasa	<u>E. Coli</u>
Treonina deaminasa (degradativa)	<u>E. Coli</u>
Glicerocinasa	<u>E. Coli</u>
Glutamato deshidrogenasa	<u>E. Coli</u>
Glutaminasa A	<u>E. Coli</u>
Glutamina sintetasa	<u>E. Coli</u>

Proteína	Organismo
Timidina Fosforilasa	<u>E. Coli</u>
Pseudorilato sintetasa	<u>E. Coli</u>
Guanosin-5-monofosfato reductasa	<u>E. Coli</u>
Cloramfenicol acetil transferasa	<u>E. Coli</u>
Estreptomycin adenil transferasa	<u>E. Coli</u>
Proteínas flagelares	<u>E. Coli</u>
Enzima II del sistema fosfotransferasa	<u>E. Coli</u>
Proteínas codificadas para el operón Ara	<u>S. typhimurium.</u>
Enzimas requeridas para la utilización de manitol	<u>S. typhimurium.</u>
Proteínas e histiadasa del operón Lac	<u>Klebsiela aerogenes</u>
Represor requerido para la lisogениzación del fago P22	<u>S. typhimurium</u>
Colinesterasa	<u>Pseudomonas aeruginosa</u>
Luciferasa	<u>Photobacterium fischeri</u>
"Transposicionadores" para los aniones de ácidos tricarbóxicos C ₆ .	<u>Azotobacter vinelandii</u>

Este efecto a nivel transcripcional está comprobado y constituye una verdadera prueba de la validez que encierra proponer una hipótesis que explique de una manera congruente los efectos del AMP cíclico en los microorganismos.

En organismos con células eucariotes desempeña importantes funciones además de ser el mensajero químico de las hormonas polipeptídicas. Una de estas funciones es aún más específica

ca y relevante que el de RNA mensajero, ya que propiciará la sin tesis de proteínas enzimáticas que sólo con su presencia se pueden llevar a cabo.

La forma en que realiza el AMP cíclico su función a nivel transcripcional en microorganismos podría ser el punto de partida para proponer un mecanismo de acción del AMP cíclico en organismos con células eucariotes.

En microorganismos procarióticos, el mecanismo de acción del AMP cíclico a un nivel transcripcional tendrá como base la hipótesis de Jacob y Monod complementándose con la idea básica de simplificar y conjuntar los factores que intervienen en la síntesis de RNA mensajero para dar origen a proteínas enzimáticas especializadas (52-53).

Esta idea es la formación de un complejo entre la RNA polimerasa y el AMP cíclico trayendo como consecuencia la apertura (en algunos casos) de genes bloqueados, el incremento en la velocidad de síntesis de RNA mensajero de genes reprimidos y con esto, la economización de energía y la subsistencia de organismos en medios adversos, con lo cual cumpliría su cometido esta proposición.

El AMP cíclico y la proteína receptora de este mismo, son requeridos para la formación del complejo de preiniciación entre estos y la RNA polimerasa en el promotor de muchos operones reprimidos del catabolito. La proteína receptora del AMP cíclico se considera una proteína alostérica en la cual el AMP cíclico propicia un cambio conformacional necesario para el enlazamiento del ácido desoxiribonucleico (DNA). La evidencia en que se basan los cambios conformacionales en la proteína receptora han sido derivados por dos procedimientos diferentes. El ataque proteolítico de la proteína receptora en presencia de AMP cíclico en una forma modificada de dicha proteína, la cual ha perdido la habilidad para enlazarse al DNA, mientras que es capaz aún

de enlazarse al AMP cíclico. La proteína receptora del AMP cíclico unida covalentemente con un grupo cercano sensible a la fluorescencia, muestra propiedades fluorescentes alteradas en presencia de AMP cíclico, indicando una transición conformacional en la proteína.

La ventaja que presenta la proposición de este mecanismo es la concordancia teórica-experimental de los distintos autores. Así, podemos manejar este modelo hasta agotar las posibilidades de explicación que sugieran en una separación entre la teoría y la observación; si por el contrario, nuevos horizontes se descubren satisfactorios a una explicación mecanística mediante este modelo, la idea básica se habrá fortalecido y comprobado lo suficiente, como para extrapolarla a casos más complejos donde intervenga como un factor principal el AMP cíclico (54,55).

Así tendremos que la transición de un procarionte a un organismo con células eucarióticas, dentro de las funciones en que interviene el AMP cíclico, podrían explicarse en base a la idea anterior de la formación del complejo doble. El cual, junto con la evolución propia de las distintas especies, tendría que adoptar una nueva fisonomía tomando en consideración los diversos factores que intervienen en organismos pluricelulares.

En el caso particular del *Dictyostelium discoideum* el efecto del AMP cíclico se ha estudiado como resultado de una manifestación de caracteres aparecidos debido a su presencia (56,57). Así tendremos el caso de la agregación celular en estos microorganismos, la cual está regulada por el AMP cíclico y es dependiente del ión calcio (58). El enlazamiento del AMP cíclico está limitado a aquellas especies que usan a este nucleótido como agente quimiotáctico.

En vista del papel prominente que juega el AMP cíclico en la expresión genética, no es descabellado anticipar que jugará un papel significativo en los procesos que regulen la embriogénesis -

y la diferenciación (59,60). En este plano en particular, la participación de la ciclasa está en sus albores. Podemos señalar un ejemplo reportado del AMP cíclico sobre la diferenciación, se encuentra en los mohos pluricelulares (61). En sus primeras etapas estos organismos se presentan como seres unicelulares y para la formación del pseudoplasmodio por el moho de humedad *D. discoideum* la migración de la forma intermediaria parece estar regulada por la humedad relativa. Finalmente el pseudoplasmodio se transforma en el organismo maduro; por lo que se incrementa la concentración del AMP cíclico al final del tallo las plántulas inducidas son iguales a aquellas que surgen en el curso normal de la diferenciación pseudoplasmodial para producir el organismo maduro para la reproducción.

De aquí podría aparecer que el AMP cíclico tiene un papel en la diferenciación de al menos un tipo de células en el desarrollo del *D. discoideum* dentro de su forma reproductiva.

Se han obtenido algunas evidencias directas para la presencia de AMP cíclico en plantas superiores y algas por una variedad de procedimientos (62,63,64,65,66). Además la AMP cíclico fosfodiesterasa ha sido detectada en plantas superiores (67,68) incluyendo la demostración de actividades inhibidas por metilxantinas, las cuales se conocen que inhiben la nucleótido-cíclico fosfodiesterasa en mamíferos. Sin embargo, las especificidades, de estas fosfodiesterasas quedan por resolverse.

La posibilidad de que el AMP cíclico puede actuar como un segundo mensajero en las células de plantas superiores regulando los efectos de fitohormonas está respaldada por experimentos indicando un recambio incrementado de AMP cíclico en el tejido de las plantas respecto a la aplicación del ácido-(3)-indol-acético (66,67) el ácido giberélico (65).

La elevación de los niveles de AMP cíclico en coleoptilo -

de avena ocurre como una consecuencia del tratamiento con el ácido indol-3-acético (67).

En experimentos de reemplazamiento de fitohormonas el AMP cíclico ha demostrado respuestas aparentemente similares con respecto al ácido-3-indolacético (66,70,71,72) y ácido giberélico (73-85) en bioensayos apropiados.

Como una evidencia considerable sugiriendo un papel regulador del crecimiento de plantas superiores por el AMP cíclico, es muy interesante la investigación que se ha llevado al cabo en torno a la germinación, ya que el modelo propuesto para microorganismos sirve como plataforma mecanística para establecer la función del AMP cíclico en organismos pluricelulares.

El modelo de trabajo de los Drs. F. García Jiménez y B. A. Arreguín (86) para explicar la participación del ácido indol acético, ácido giberélico y ácido abscísico, junto con citoquininas durante la germinación, está basado en la posible participación de estos a través de la formación de un complejo triple de la forma general:

Hormona-citoquinina-Nucleótido-RNA polimerasa.

Todo esto a nivel transcripcional. Además es posible que los diversos complejos pudieran estar en equilibrio cinético. Suponen además, que las citoquininas participen como fosfato cíclico de un nucleótido similar al adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico). El complejo triple con ácido giberélico podría ser la llave maestra capaz de abrir el código de germinación para las células embriónicas. Las tres piezas del complejo, podrían tener papeles específicos, así pues, la RNA polimerasa podría identificar un codón de iniciación del DNA maduro, formando un complejo de iniciación con él, el nucleótido cíclico localizaría el punto de iniciación específico para el operón y deter

minaría el inicio del RNA transcribible, mientras el ácido giberélico ejercería un desenvolvimiento de la doble hélice rompiendo los puentes de hidrógeno interbásicos del DNA. El complejo triple: ácido indol acético-citoquinín-monofosfato cíclico-RNA polimerasa, (AIA-RNA polimerasa-citoquinín-monofosfato-cíclico), sería una clave lectora y el complejo triple ácido-abiótico-citoquinín-monofosfato cíclico-RNA polimerasa un complejo de inhibición. Hay una atractiva posibilidad de hacer extensivo este modelo para explicar otras interacciones hormona-célula.

La proposición de la formación de un complejo triple : - Hormona- nucleótido cíclico- RNA polimerasa durante la germinación nos orienta para hacer extensiva esta idea a otros niveles de organización celular donde el AMP cíclico (en particular) intervenga en un papel transcripcional. De tal forma podemos citar el efecto que realiza el AMP cíclico en insectos - (87,88,89), donde este nucleótido ha sido identificado junto con la enzima responsable de su síntesis en homogenados de larva de mosca.

Los reportes aparecidos al respecto indican la acción sinérgica entre la ecdisona y el AMP cíclico. Se han reunido varios criterios demostrando que la hormona actúa vía AMP cíclico. Un prerrequisito de que el nivel de AMP cíclico se incremente antes o coincidiendo con incrementos en la síntesis de RNA y proteínas, se satisface por los experimentos conducidos para B-ecdisona sobre las pupas de *H. gloveri* (90) in vivo y sobretodo la epidermis del ala in vitro.

La acción específica del esteroide ecdisterona, un derivado hidroxilado de la hormona responsable de la metamorfosis ecdisona, sobre la actividad de ciertos genes se incrementa por el AMP cíclico. La interacción del AMP cíclico con el esteroide sobre la actividad genética fué estudiada en experi -

mentos in vitro en glándulas salivales de *Drosophila hydei*. La expresión morfológica de la actividad genética inducida por ecdisterona se visualiza por el desenrollamiento de la doble hélice del DNA (formación de puffs específicos). El tamaño de uno de estos puffs, 78B se usa como medida de la actividad genética inducida por el esteroide. La inducción de este puff por diversas concentraciones subóptimas de ecdisterona en presencia de AMP cíclico en el medio de incubación revela un incremento significativo en el tamaño del puff, comparado con concentraciones idénticas del esteroide en un medio pobre en AMP cíclico, esto sugiere un papel de un sistema adenilato ciclasa en el mecanismo de acción de la hormona esteroideal en insectos.

La confluencia de factores transcripcionales similares entre la germinación y los insectos, así como los productos y efectos resultantes de esta conjunción, nos inducen a pensar en la formación de un complejo triple : Hormona esteroideal-AMP cíclico-RNA polimerasa como nuestra base mecanística fundamental para explicar el papel del AMP cíclico a un nivel transcripcional.

Pensemos que el AMP cíclico no debe involucrarse únicamente en la acción de hormonas controlantes del crecimiento y desarrollo en insectos, sino que este nucleótido cíclico podría jugar también un papel importante al controlar los procesos fisiológicos rutinarios de insectos.

Experimentos preliminares indican que la B-ecdisona estimula también a la guanil ciclasa y sugieren que el GMP cíclico puede jugar un papel significativo regulando la influencia de B-ecdisona sobre las células objetivo (90).

Cuando consideramos la regulación hormonal (91) impuesta a un sistema dado, es claro que frecuentemente existan dos grupos

de agentes, uno actuando en oposición del otro. A pesar de lo que se ha discutido anteriormente se podría pensar que se aplica únicamente para un efector intracelular (por ejemplo AMP cíclico) que interviene en las influencias regulatorias, los efectos positivos y negativos podrían ser controlados por un sólo sistema, es decir, a través de cambios bidireccionales en las concentraciones celulares de AMP cíclico. Pero parece igualmente razonable esperar que estas acciones regulatorias fueran mediadas por efectores intracelulares separados, los cuales también actuarían en oposición uno con respecto al otro. Igualmente importante es la consideración que aunque las acciones de ciertas hormonas parecen en general antagónicas unas de otras en un sistema en particular, existen un número de ejemplos donde estas acciones se manifiestan simultáneamente. Parece apropiado por consiguiente definir los mecanismos por los cuales la regulación hormonal se impone, postulando la existencia de diferentes efectores intracelulares mejor que un sólo componente.

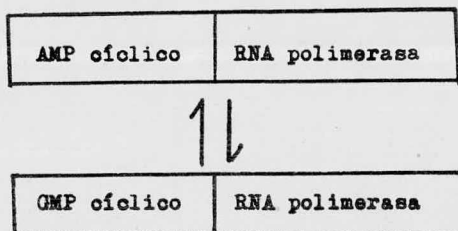
En consecuencia se inició la investigación para otro componente celular que pudiera estar involucrado en la promoción de eventos celulares que pudieran considerarse "opuestos" o de un carácter marcadamente diferente de aquéllos que ocurren cuando los niveles de AMP cíclico se incrementan. Los experimentos conducidos en este sentido llevaron a una serie de descubrimientos ligando al menos alguno de los otros nucleótidos cíclicos (GMP cíclico) con la acción de un gran número de agentes biológicamente activos, los cuales producirían tales respuestas celulares (92,93).

A partir de esta serie de observaciones se concluyó que existen muchos sistemas biológicos en los cuales el GMP cíclico y el AMP cíclico presentan un notable contraste, a menudo con influencias regulatorias antagónicas. Creemos que este concep-

to de la regulación biológica a través de acciones opuestas de -
dos nucleótidos cíclicos está bien descrito por un antiguo con -
cepto oriental conocido con el nombre de YING-YANG (94). El -
YING-YANG simboliza un dualismo entre fuerzas naturales opuestas
pero también hay que considerar que bajo ciertas circunstancias-
estas fuerzas deberán entrar en una interacción mutua resultando
en una síntesis. En su forma más simple la hipótesis define al-
AMP cíclico y al GMP cíclico como efectores biológicos involucra
dos en la regulación de funciones celulares que están controla -
das bidireccionalmente, como el que está en un estado funcional
y es susceptible a influencias estimulatorias e inhibitorias. -
El proceso deberá involucrar un camino simple y/o caminos opues-
tos unidireccionales que se afectan recíprocamente. Postulamos
que hay dos tipos básicos de sistemas controlados bidireccional-
mente: sistema tipo A, los cuales están facilitados por el AMP-
cíclico y suprimidos por el GMP cíclico; y sistemas tipo B, los-
cuales están promovidos por el GMP cíclico e inhibidos por el -
AMP cíclico. Tomando en consideración también la posibilidad -
de que ciertas funciones celulares no están controladas bidirec-
cionalmente pero deben responder a un sólo tipo de señal regula-
dora estimulante. Tal proceso celular, que consideramos monodi-
reccionalmente regulado, se esperaría que existiese en un estado
ordinariamente no funcional, transformándose " en activado" -
cuando se introduce una señal apropiada y que regresa pasivamen-
te al estado no funcional cuando la señal positiva se elimina. -
La posibilidad de que existan sistemas controlados monodireccio-
nalmente, es solamente una conjetura. Su existencia ha sido -
postulada para dar razón de la regulación de ciertos eventos ce-
lulares tal como la esteroideogénesis adrenocortical, para lo -
cual se reconoce una señal positiva (por ejemplo HACT) pero no-
se ha descubierto todavía un factor fisiológico inhibitorio. -
En un sistema monodireccional los dos nucleótidos cíclicos po -
drían actuar cooperativamente, ya sea como efectores positivos -
de diferentes pasos secuenciales en un proceso completo o como -

mediadores intracelulares de diferentes señales estimulantes extracelulares, las cuales en diversas combinaciones podrían producir alguna respuesta celular diferente ya sea cualitativa o cuantitativa.

En organismos superiores trataremos de explicar estos efectos que experimentalmente se han comprobado proponiendo la siguiente hipótesis mecanística similar a la conocida para *E. coli*. La formación de un complejo doble entre el nucleótido cíclico monofosfato- RNA polimerasa, el cual sería la llave de apertura para ciertos códigos del DNA estableciéndose una compatencia entre los distintos nucleótidos cíclicos para llevar a cabo las respuestas celulares características, debido a la presencia del nucleótido que condiciona la desaparición o inhibición del otro.



Este complejo doble se enlaza al DNA, produciéndose así diversas proteínas enzimáticas características para dar una respuesta adecuada al estímulo propiciado por la hormona. De tal forma una hormona estimulará la producción no de una sola proteína, sino las necesarias para llevar a efecto un ciclo biológico.

Una vez propuesta la formación de un complejo doble RNA polimerasa-AMP cíclico, para organismos inferiores, es de esperarse que la conjunción de tres factores con la influencia transcripcional hormona--RNA polimerasa-AMP cíclico formen un comple-

jo cuyos productos sean tan específicos como sea indispensable-- en respuesta al estímulo hormonal.

Sin embargo, la regulación de la expresión genética en células eucariotes es mucho más compleja que en bacterias y no se entiende aún en detalle. Estas células muestran inducción enzimática en presencia de sustratos específicos y ciertas hormonas. - Algunas hormonas se unen a proteínas receptoras, el complejo resultante hormona-receptor se une a sitios específicos en la cromatina y de aquí promueve la transcripción de ciertos genes. - Las actividades enzimáticas específicas son también encendidas y apagadas durante el ciclo celular; los reguladores son el AMP cíclico y el GMP cíclico. Durante la diferenciación y desarrollo en eucariotes algunos genes son transcritos y otros reprimidos. Las células eucariotes no tienen operones simples; los genes para secuencias enzimáticas se encuentran dispersos en cromosomas diferentes. Las histonas de la cromatina que se habían postulado como represores son probablemente elementos que regulan el estado de diferenciación celular. Siendo la formación del complejo triple antes señalado la explicación que nos parece más congruente para explicar las complejas interacciones hormona-nucleótido cíclico.

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

El hecho de que las células posean mecanismos exactamente programados para regular las condiciones relativas de las diferentes proteínas que sintetiza, puede deducirse intuitivamente. Sin embargo, ¿cómo lo explicaríamos?. Veamos el siguiente ejemplo: el número de moléculas de aquellas enzimas que catalizan una vía metabólica principal podría esperarse mucho mayor que el número de moléculas enzimáticas que catalizan la biosíntesis de coenzimas, las cuales son hechas únicamente en pequeñas cantidades. Pero examinemos algunos datos reales. Las células de *E. coli* contienen los genes para quizás 3,000 proteínas diferentes. Si asumimos que todas las proteínas tienen el mismo peso molecular y que son hechas en igual número, debían existir alrededor de 3,000 copias de cada proteína en la célula de *E. coli*; sin embargo el número de copias de los diferentes tipos de proteínas varía característicamente dentro de un amplio rango. Un tipo sencillo de células de *E. coli* contiene alrededor de 15,000 ribosomas; por lo tanto cada una de las 50 o más proteínas ribosomales estaría presente con casi 15,000 copias. Algunas enzimas particularmente aquellas de la vía glucolítica pueden estar presentes en 100,000 o más copias. Por otro lado, la enzima B-galactosidasa normalmente está presente en una cantidad cercana a cinco copias por célula. Algunas proteínas están en números constantes, tales como los de la vía glucolítica, mientras que otras cambian dramáticamente su concentración en respuesta a cambios exigidos para la disposición de ciertos nutrientes presentes en el medio de cultivo. Así tenemos que cuando células de *E. coli* se colocan en un medio de cultivo conteniendo lactosa como fuente exclusiva de carbón, al principio son incapaces de utilizarla; pero al cabo de uno o dos minutos responden sintetizando B-galactosidasa en grandes cantidades, por encima de las 5,000 copias por célula. La B-galactosidasa inducida hidroliza la lactosa a productos que pueden ser usados directamente como -

f. fuente de carbón y combustibles. Si las células inducidas son transferidas a un medio fresco conteniendo glucosa pero no lactosa, la síntesis de B-galactosidasa cesa inmediatamente.

Este ejemplo de inducción enzimática lo podemos explicar fácilmente mediante la hipótesis de formación de un complejo doble-AMP cíclico-RNA polimerasa.

En ausencia de glucosa la concentración de AMP cíclico se incrementa resultando un aumento en el número de complejos dobles AMP cíclico-RNA polimerasa (se entiende que el AMP cíclico ya está unido a su proteína receptora), los cuales son agentes transcripcionales responsables de la síntesis de diferentes proteínas enzimáticas en células eucariotes.

En organismos eucariotes la regulación de la biosíntesis de proteínas posee magnitudes diferentes y se entenderá a esta, como un vehículo para la diferenciación celular.

Así tendremos que la complejidad de los productos resultantes en una célula dependerá de la conjunción de factores transcripcionales que lleven al cabo la apertura de códigos genéticos característicos, capaces de mantener la especialización de cada célula como respuesta a un medio determinado. Esto lo podríamos representar gráficamente de la siguiente forma:

Un ejemplo de lo anterior pudiera estar ilustrado por la participación del AMP cíclico en la regulación de la función del tiroides, donde su acción estimula la producción y liberación de la hormona Figura 12.

La hormona liberadora de tirotrópina producida en el hipotálamo estimula la adenil ciclase en las células tirotrópicas de la glándula pituitaria anterior. El ascenso resultante en el nivel de AMP cíclico en estas células estimula la liberación de la hormona estimulante del tiroides (HET), las cuales a su vez viajan a la glándula tiroides para estimular la adenil ciclase de allí. Esto resulta en un incremento en el nivel de AMP cíclico el cual lleva a la liberación de la hormona tiroides, principalmente triyodotironina (T_3). En muchas células T_3 puede actuar para facilitar la acción de hormonas las cuales estimulan la adenil ciclase; pero en células tirotrópicas actúa para inhibir la acción de la hormona liberadora de tirotrópina (HLT). Esto podría explicarse por la activación en estas células no de AMP cíclico, sino de GMP cíclico que produciría complejos competitivos con el AMP cíclico de acuerdo al esquema anterior.

En este como en otros casos, el mecanismo más idóneo para explicar este efecto del AMP cíclico es la formación de un complejo triple en cada uno de los pasos de que consta este mecanismo en particular, puesto que es claro que sólo un efecto transcripcional podría originar la síntesis de los diversos productos hormonales.

F A C T O R E S
T R A N S C R I P C I O N A L E S

T I P O S D E
G E N E

RNA polimerasa

Generales.

AMP cíclico	RNA polimerasa
-------------	----------------

Específicos.

Hormona	AMP cíclico	RNA polimerasa
---------	-------------	----------------

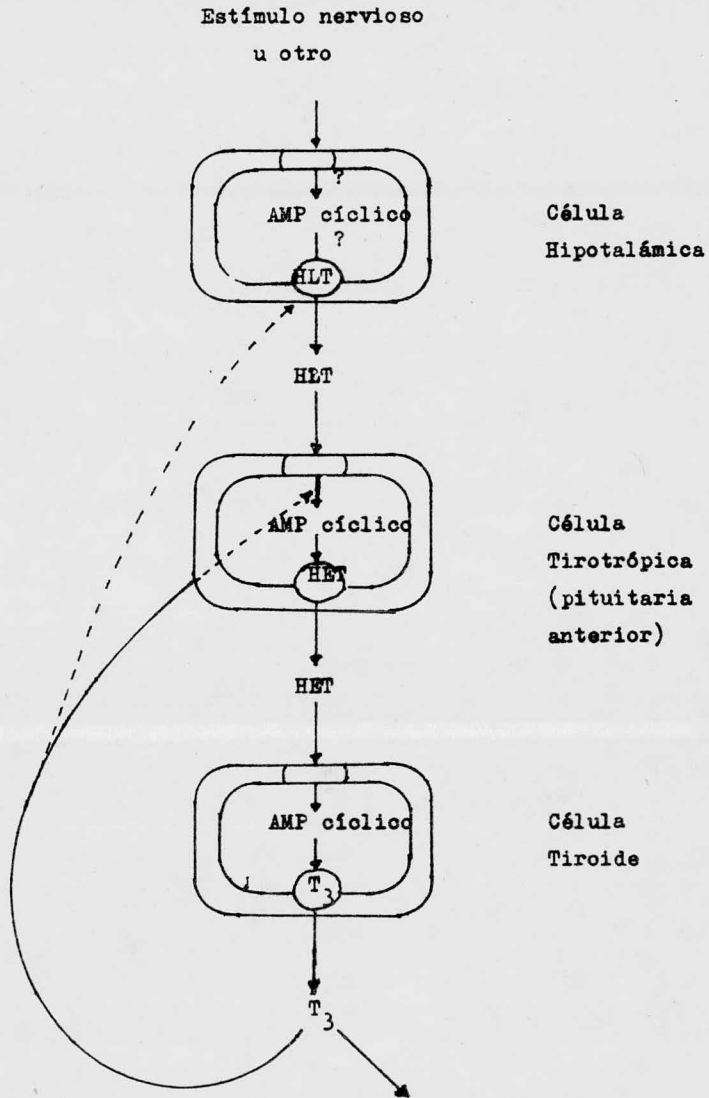
Especializados.

F O R M A G E N E R A L I Z A D A

Hormona	XMP cíclico	RNA polimerasa
---------	-------------	----------------

Especializados.

donde X será la base púrica o pirimídica que determine la naturaleza del nucleótido cíclico.



HLT - Hormona liberadora tirotrópica
 HET - Hormona estimulante de tiroides
 T₃ - Triyodotironina

Figura 12. Participación del AMP cíclico en la regulación de la -
 función tiroides.

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

- 1.- Sutherland E.W. and Rall T.W. (1960) *Pharmacol Rev* 12, 265
- 2.- Sutherland E.W. (1962) *Harvey Lectures* 57, 17
- 3.- Sutherland E.W., Øye I. and Butcher R.W. (1965) *Recent -
Progr Hormone Res* 21, 623
- 4.- Cohen P. (1976) *TIBS-February* 38
- 5.- Sutherland E.W., Rall T.W. and Menon T. (1962) *J Biol Chem* 237, 1 220
- 6.- Cook W.H., Lipkin D. and Markham R. (1957) *J Am Chem Soc-*
79, 3 607
- 7.- Grahame-Smith D.G., Butcher R.W., Ney R.L. and Sutherland
E.W. (1965) *J Biol Chem* 240, 4 515
- 8.- Rall T.W. and Sutherland E.W. (1962) *J Biol Chem* 237, -
1 228
- 9.- Brown E.G., Newton R.P. (1973) *Phytochemistry* 12, 2 683
- 10.- Giannattasio M. and Macchia V. (1973) *Plant Sci Lett* 1, -
259
- 11.- Wood H.N., Lin M.C. and Braun A.C. (1972) *Proc Nat Acad -
Sci USA* 69, 403
- 12.- Van Heyningen S. (1976) *Biochem J* 157, 785
- 13.- Birnbaumer L. and Rodbell M. (1969) *J Biol Chem* 244, 3 477
- 14.- Bitensky M.W., Clancy J.W and Gamache E. (1967) *J Clin -
Invest* 46, 1 037
- 15.- Øye I. and Sutherland E.W. (1966) *Biochim Biophys Acta -
127, 347*
- 16.- Cuatrecasas P. (1974) *Ann Rev Biochem* 43, 169
- 17.- Butcher R.W., Baird C.E. and Sutherland E.W. (1968) *J Biol
Chem* 243, 1 705
- 18.- Rall T.W. and Sutherland E.W. (1958) *J Biol Chem* 232, 1 065
- 19.- Argy W.P., Handler J.S. and Orloff J. (1967) *Amer J -*

- Physiol. 213, 803.
- 20.- Petersen M. J. and Edelman I.S. (1964) J. Clin. Invest. -
43, 583.
- 21.- Steiner A.L., Peake G.T., Utiger R.D., Karl I.E. and Kip-
nis D.M. (1970) Endocrinology 86, 1 354.
- 22.- Langan T.A. (1969) Proc natn Acad Sci U. S.A. 64, 1 276.
- 23.- Sutherland E.W. and Rall T.W. (1958) J Biol Chem 232, -
1 077.
- 24.- Brooker G., Thomas L.J. and Appleman M.N. (1968) Bioche-
mistry 10, 311.
- 25.- Jard S. and Bernard M. (1970) Biochem Biophys Res Commun-
41, 781.
- 26.- Thomson W.J. and Appleman M.N. (1971) Biochemistry 10, -
311
- 27.- Loten E.G. and Sneyd J.G.T. (1970) Biochem J 120, 187.
- 28.- Williams R. (1974) Textbook of Endocrinology 5th ed.
- 29.- Huxley J.S. (1935) Biol Rev 10, 427.
- 30.- Tomasz A. (1965) Nature (London) 208, 155.
- 31.- Harper H.A. (1975) Review of Physiological Chemistry 15th
ed, Lange Medical Publications
- 32.- Major P.W. and Kilpatrick R. (1972) J endocr 52, 593
- 33.- Greengard P and Costa E. (1970) Role of Cyclic AMP in -
Cell Function. Raven Press, New York.
- 34.- Killilea D.S., Brandt H. and Lee E.Y.C. (1976) TIBS fe -
bruary, 30
- 35.- Robison G.A., Butcher E.W. and Sutherland E.W. (1971) -
Cyclic AMP, Academic New York.
- 36.- Pastan I. and Perlman R. (1970) Science 169, 339 -
- 37.- Gerish G et al (1975) Nature (London) 255, 547 -
- 38.- Epps H.M.R. and Gale E.F. (1942) Biochem J 32, 619 -
- 39.- Magasanik B. (1961) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol -
- 40.- Makman R.S. and Sutherland E.W (1965) J Biol Chem 240, -
1 309
- 41.- Perlman R., deCombrughe B. and Pastan I. (1969) Nature -

223, 810.

- 42.- Perlman R. and Pastan I. (1968) *Biochem Biophys Res Commun* 30, 656. -
- 43.- Perlman R, and Pastan I. (1968) *J Biol Chem* 243, 5 420. -
- 44.- Gillespie D. and Spiegelman S. (1965) *J Mol Biol* 12, 829.
- 45.- Nakada D. and Magasanik B (1964) *J Biol Mol* 8, 105. -
- 46.- Varmus H.E., Perlman R and deCrombrugge (1970) *Fed Proc.*
- 47.- Gilbert W. and Muller-Hill B. (1967) *Proc Nat Acad Sci U.S.* 58, 2 415. -
- 48.- Pastan I. and Perlman R. (1968) *Proc Nat Acad Sci U.S.* 61, 1 336. -
- 49.- Zubay G., Schwartz D. and Beckwith J.R., in *Role of Adenyl Cyclase and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate in Biological Systems*, T. Rall, M. Rodbell, P.G. Condliffe -
Editors. Government Printing Office, Washington, D.C. -
- 50.- Dickson R.C., Abelson J. Barnes W.M. and Reznikoff W.S. (1975) *Science* 187, 34. -
- 51.- Jacob F. and Monod J. (1961) *J Mol Biol* 3, 318.
- 52.- Riikenberg H.V. (1974) *Annu Rev Microbiol* 28, 353.
- 53.- Nakanishi S., Adhya S., Gottesman M.E. and Pastan I. (1973) *J Biol Chem* 248, 5 937 -
- 54.- Krakow J.S. (1975) *Biochem and Biophys Acta* 383, 345. -
- 55.- DeCrombrugge B., Chen B., Anderson W., Nissley P., Gottesman M. and Pastan I (1971) *Nat New Biol* 231, 139. -
- 56.- Mato J.M. (1975) *Biochim et Biophys Acta* 385, 173. -
- 57.- Yanagisawa K.O. et al (1974) *J Biochem (Tokio)* 75, 1 321
- 58.- Mason J.W. et al (1971) *Exp Cell Res* 67, 156. -
- 59.- Hong J.S. and Ames B.N. (1971) *Proc Nat Acad Sci U.S.* 68-
2 258.
- 60.- Bonner J.T. (1971) *Ann Rev of Microbiology* 25, 75. -
- 61.- Piovant M., Lazdunski C. and Cailba H. (1974) *FEBS Lett* 46, 42 -
- 62.- Pollard C.J. (1970) *Biochim Biophys Acta* 201, 511 -
- 63.- Narayanan A. Vermursch J. and Pradet A (1970) *C.R Acad* -
- 64.- Azhar S. and Murti K. (1971) *C.R. Biochem Biophys Res* -

Commun 43, 58.

- 65.- Salomon D. and Mascarenhas J.P. (1971) Life Sci 10, 879.-
- 66.- Salomon D. and Mascarenhas J.P. (1972) Plant Physiol Su -
ppl 50, 30.
- 67.- Amrheni V. and Filner P. (1973) Proc Nat Acad Sci U.S.A. -
70, 1 079.
- 68.- Wood H.N., Lin M.C. and Bram A.C. (1972) Proc Nat Acad -
Sci U.S.A. 69, 403.
- 69.- Harvey C.L., Olson K.C. and Wright R. (1970) Biochemistry
9, 921.
- 70.- Salomon D. and Mascarenhas J.P. (1971) Z Pflanzenphysiol
65, 385.
- 71.- Salomon D. and Mascarenhas J.P. (1972) Biochem Biophys -
Res Commun 47, 134.
- 72.- Weintraub R.L. and Lawson V.R. (1972) Plant Physiol -
Suppl 50, 30.
- 73.- Duffus C.M. and Duffus J.H. (1969) Experientia 25, 581. -
- 74.- Galsky A.G. and Lippincott J.A. (1969) Plant Cell Physiol
10, 607.
- 75.- Nicksels M.W., Schaefer G.M. and Galsky A.G. (1971) Plant
Cell Physiol 12, 717.
- 76.- Earle K.M. and Galsky A.G. (1972) Plant Cell Physiol 12 -
727.
- 77.- Gilbert M.L. and Galsky A.G. (1972) Plant Cell Physiol -
13, 867.
- 78.- Pollard C.J. (1971) Biochim Biophys Acta 252, 553. -
- 79.- Kamisaka S. and Masuda Y (1970) Naturwissenschaften -
57, 546.
- 80.- Kamisaka S. (1972) Plant Cell Physiol 12, 1 003
- 81.- Kamisaka S. (1972) in Plant Growth Substances 1970 Ed. -
Carr D.J. (Springer-Verlag, Berlin)
- 82.- Kamisaka S., Sano M., Katsumi M and Masuda Y. (1972) -
Plant Cell Physiol 13, 167.
- 83.- Kessler B. and Kaplan B. (1972) Physiol Plant 27, 424.
- 84.- Hartung W. (1973) Z Pflanzenphysiol 68, 329.

- 85.- Elliot D.C. (1973) Proc Aust Biochem Soc 6, 41. -
- 86.- Garcia F. and Arreguin B. (1976) J Cell Biol 70, 47a -
- 88.- Leenders H.J., Williams G.J. and Berendes H.D. (1970) Exp -
Cell Res 63, 159.
- 89.- Hardman J.G., Robison G.A. and Sutherland E.W. (1971) Annu -
Rev Physiol 33, 311.
- 90.- Applebaum S.W. et al (1972) Develop Biol 27, 165. -
- 91.- Sutherland E.W. (1972) Science 177, 401.
- 92.- Weissmann G. (1975) Ann N.Y. Acad Sci 253, 750.
- 93.- Anderson C. et al (1971) J Biol Chem 246, 5 929.
- 94.- Goldberg V.D., Haddox M.K., Hartle D.K. and Hadden J.W. -
(1972). Pharmacology and the future of the man, 5th Inter -
national Congress on Pharmacology, San Francisco. 5, 146.