

77
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVIDENCIA DE UNA PROTEINA G INHIBITORIA EN EL SISTEMA ENZIMATICO DE LA ADENILATO CICLASA SENSIBLE A HORMONA PARATI- ROIDEA DE MEMBRANAS BASOLATERALES DE CORTEZA RENAL CANINA

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A N :

GONZALEZ CARRILLO ANA LAURA
SANTINELLI NUÑEZ BLANCA ESTELA

CIUDAD UNIVERSITARIA D.F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El sistema enzimático de la adenilato ciclasa representa una de las principales vías de transducción de la señal hormonal que regula la respuesta de las células a señales específicas, las cuales llevan a cabo una serie de procesos bioquímicos que dan por resultado un efecto global, y en los que interviene como segundo mensajero el AMPc.

La preparación de membranas basolaterales de corteza renal canina (MBCRC) enriquecidas en adenilato ciclasa (AC) sensibles a hormona paratiroidea (PTH) ha permitido conocer la participación de cada uno de los elementos del sistema: receptores (R_s y R_i), proteínas G (G_s y G_i), enzima amplificadora (AC) y cationes divalentes (Mg^{++}).

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes: a) contar con las herramientas necesarias para el estudio in vitro del sistema enzimático de la AC sensible a PTH y b) valorar la funcionalidad del sistema aislado a través de su activación a diferentes niveles y evidenciar física y funcionalmente a la proteína G_i para el estudio de algunos aspectos de los mecanismos involucrados en la regulación de la AC y de la PTH.

Se utilizó la siguiente metodología: se estandarizó un método de radioinmunoanálisis (RIA) para poder cuantificar el AMPc generado. Se aislaron MBCRC de 9 perros mestizos adultos alimentados ad libitum con un peso promedio de 15 kg. El aislamiento se realizó por centrifugación diferencial y ultracentrifugación sobre gradientes discontinuos de sacarosa y la concentración de proteínas de MBCRC se ajustó a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La

actividad de la AC en las membranas aisladas se midió por la cuantificación de AMPc generado a partir del sustrato ATP, en presencia de un sistema regenerador de ATP, y los resultados se informaron en pmol de AMPc/mg prot/30 min. La funcionalidad del sistema de la AC se probó a diferentes niveles (receptores, proteínas G y unidad catalítica) por medio de los siguientes activadores: PTH, GTP, GTPγS, forskolina y MgCl₂ con distintas concentraciones. Para evaluar la actividad de la proteína Gi, se probó el sistema con GTP y GTPγS en presencia y ausencia de PTH y forskolina. La actividad de la toxina pertussis (PTX), se valoró mediante un ensayo biológico *in vivo* usando ratas Wistar macho de aproximadamente 150 g de peso, en las que se comparó la frecuencia cardíaca del grupo tratado con PTX a dosis de 50 µg/100 g de peso corporal con el grupo control. Las membranas se ADP ribosilaron con PTX en presencia de NAD-³²P; por otro lado, se ADP ribosilaron para mantener activo al sistema enzimático.

Los datos obtenidos comprueban que contamos con técnicas necesarias para el estudio *in vitro* del sistema enzimático de la AC, el cual se encontró funcional en conjunto y pudo activarse en sus diferentes niveles (receptores, proteínas G y unidad catalítica). El magnesio resultó ser de suma importancia en la regulación de la actividad de las proteínas G que estimulan o inhiben a la ciclase debido a que en su ausencia la producción de AMPc disminuyó intensamente. Por otra parte en las membranas se identificó a la subunidad alfa de Gi mediante la utilización de la PTX y NAD-³²P. También se evidenció de manera funcional a la proteína Gi con el uso de diferentes activadores del sistema en

donde se observó un comportamiento bifásico que apoya una regulación dual tanto por Gs como por Gi de la actividad del sistema enzimático de la AC.

GLOSARIO

AC	Adenilato ciclasa
AMPC	Adenosin 5'3'monofosfato cíclico
AMPC ¹²⁵ I Sc-TME	Monosuccinil tirosil metil ester del AMPC Iodo 125
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ASB	Albúmina sérica de bovino
β -NAD	Dinucleótido nicotinamida adenina
β -NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
C	Unidad catalítica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendinitrilotetracetato disódico
G	Proteína G (transductor)
Gs	Proteína G estimuladora
Gi	Proteína G inhibidora
Gpp(NH)p	Guanosin 5'imidodifosfato
GTP γ S	Guanosin 5'-O-tiotrifosfato
H	Hormona
HR	Complejo hormona-receptor
HS	Hormona estimuladora
Hi	Hormona inhibidora
IBMX	Isobutil metil xantina
MBCRC	Membranas basolaterales de corteza renal canina

NAD	Nicotin amida adenina dinucleótido
PDE	Fosfodiesterasa
Pi	Fósforo inorgánico
PM	Peso molecular
PTX	Toxina pertussis
PTH	Hormona paratiroidea
PTHb	Hormona paratiroidea bovina
PTHh	Hormona paratiroidea humana
PTHb sin 1-34	Hormona paratiroidea bovina sintética 1-34
R	Receptor
Ri	Receptor inhibidor
Re	Receptor estimulador
RIA	Radioinmunoanálisis
α	Subunidad alfa
α_i	Subunidad alfa inhibidora
α_s	Subunidad alfa estimuladora
β	Subunidad beta
γ	Subunidad gamma

INDICE

	Pag
I INTRODUCCION.....	1
1. COMUNICACION CELULAR.....	1
2. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SENAL HORMONAL.....	2
2.1 Sistema de la adenilato ciclasa sensible a hormonas.....	3
2.1.1 Receptores.....	5
2.1.2 Proteinas G.....	7
2.1.2.1 Proteina G estimuladora (Gs).....	10
2.1.2.2 Proteina G inhibidora (Gi).....	10
2.1.3 Unidad catalitica: adenilato ciclasa (AC).....	11
3. Modelos para la regulaci3n de la actividad de la AC.....	12
3.1 Mecanismos de activaci3n de las proteinas G.....	12
3.1.1 Modelo de disociaci3n de G para la regulaci3n de la AC por hormonas.....	12
4. ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA DE LA AC EN LA MEMBRANA PLASMATICA.....	16
4.1 Modelo de libre disociaci3n.....	16
4.2 Modelo disociaci3n restringida.....	17
5. PAPEL DEL MAGNESIO (Mg ⁺⁺) EN EL SISTEMA DE LA AC.....	18
6. ANALOGOS NO HIDROLIZABLES DE GTP: Gpp(NH)p y GTP γ S.....	18
7. PROCESOS DE DESACTIVACION EN EL SISTEMA DE LA AC.....	19
7.1 Activaci3n de la guanosin trifosfatasa (GTPasa) mediante Rs.....	19
7.2 Desensibilizaci3n y regulaci3n a la baja del receptor.....	19
7.3 Desactivaci3n a trav3s de la acci3n de agonistas inhibidores.....	20

	Pag
8. TOXINA PERTUSSIS (PTX).....	21
9. HORMONA PARATIROIDEA.....	21
9.1 Biosíntesis.....	21
9.2 Secreción.....	22
9.3 Metabolismo de la PTH.....	23
9.4 Acciones biológicas.....	23
9.5 Efectos de la PTH sobre el riñón.....	24
9.5.1 Adenilato ciclasa y AMPc.....	24
9.5.2 Manejo del fosfato.....	24
9.5.3 Manejo del calcio.....	26
9.5.4 Otros efectos renales.....	26
9.6 Mapa funcional de la molécula hormonal.....	27
II ANTECEDENTES.....	29
III HIPOTESIS.....	31
IV OBJETIVOS.....	32
V MATERIAL Y METODOS.....	33
1. Materiales.....	33
1.1 Reactivos.....	33
1.2 Equipo.....	34
1.3 Soluciones.....	35
1.4 Animales de experimentación.....	35
2. Métodos.....	36
2.1 Aislamiento de membranas basolaterales de corteza renal canina.....	36
2.2 Cuantificación de proteínas.....	38
2.3 Ensayo de adenilato ciclasa.....	39
2.4 Radioinmunoanálisis (RIA) de AMPc.....	40

	Pag
2.5 Experimentos con toxina pertussis.....	44
2.6 Valoración de la actividad de la toxina pertussis....	45
2.7 Ensayo de ADP ribosilación.....	45
2.7.1 Preactivación de la toxina pertussis.....	46
2.7.2 ADP ribosilación.....	46
2.8 Análisis estadístico.....	47
VI RESULTADOS.....	48
1. Aislamiento de membranas.....	48
2. Radioinmunoanálisis de AMPc.....	48
3. Curva de Activación con $MgCl_2$	50
4. Linealidad en la producción de AMPc respecto a cantidades crecientes de MBCRC.....	53
5. Requerimiento del Mg^{++} para la estimulación de la AC por forskolina.....	53
6. Requerimiento del Mg^{++} para la estimulación de la AC por GTP.....	55
7. Efecto de la forskolina sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}	57
8. Efecto del GTP sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}	60
9. Efecto de la PTHb sin 1-34 sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}	62
10. Efecto del GTP δ S sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}	63
11. Efecto del GTP en la actividad de la AC estimulada por forskolina en presencia de Mg^{++}	65

12. Efecto del GTP en la actividad de la AC estimulada por PTHb sin 1-34 en presencia de Mg^{++}	67
13. Efecto del GTP γ S en la actividad de la AC estimulada con forskolina en presencia de Mg^{++}	71
14. Efecto del GTP γ S en la actividad de la AC estimulada con PTHb sin 1-34 en presencia de Mg^{++}	73
15. Valoración de la actividad de la PTX.....	75
16. ADP ribosilación con $NAD-^{32}P$ de la subunidad alfa mediante el uso de la toxina pertussis (PTX).....	75
17. Experimentos de ADP ribosilación con PTX.....	77
VII DISCUSION.....	80
VIII CONCLUSIONES.....	89
IX BIBLIOGRAFIA.....	90

I INTRODUCCION

1. COMUNICACION CELULAR

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de adaptarse a las condiciones que se presentan en el medio lo cual es vital para las células, pues de no existir, serían muy escasas sus posibilidades de sobrevivir. En otras palabras, la célula tiene la capacidad de percibir los cambios que se presentan en el medio y de responder a ellos.

De igual forma, los organismos pluricelulares en presencia de un estímulo externo dan una respuesta global específica que involucra una gran cantidad de células, esta debe ser coordinada y armoniosa, y se lleva a cabo por medio de un sistema de comunicación celular (1).

En el caso de organismos pluricelulares, las células que los constituyen no viven aisladas, sino que es necesaria una elaborada comunicación entre ellas. En algunas células, la comunicación generalmente se realiza por contacto directo célula a célula. Sin embargo, también se comunican a grandes distancias, para lo cual existen productos químicos que actúan como señales y que son reconocidas por sus células blanco específicas, en donde se produce la respuesta apropiada (2,3,4).

La comunicación química, desde el punto de vista fisiológico presenta diversas variantes: la comunicación hormonal o endocrina en la que una glándula secreta una hormona a la circulación para que esta actúe sobre su órgano blanco; la neurotransmisión en la que una neurona libera al espacio sináptico al neurotransmisor para que éste active a la célula postsináptica; la neurosecreción

en la que la célula neural secreta a la circulación su mensajero; la comunicación paracrina o local, en la que el mensajero actúa sobre las células cercanas y la autocrina en la que una célula produce factores que actúan sobre ella misma (5).

Las células donde se concentra el mensaje, poseen moléculas receptoras que tienen la propiedad de reconocer e interactuar con el mensajero y de transmitir dicho mensaje para que se produzca la respuesta celular o el efecto.

Para desencadenar la respuesta es de suma importancia la interacción entre el mensajero y el receptor. Los receptores pueden estar localizados en el citoplasma, en este caso sus mensajeros son capaces de atravesar la membrana plasmática; o bien pueden encontrarse embebidos en la membrana plasmática. En cuanto a los receptores de membrana, la interacción ocurre en el exterior de la célula y la respuesta tiene lugar en el interior de la misma; por lo tanto, es necesario que se genere una señal intracelular. Debido a que la hormona actúa como primer mensajero, a la señal intracelular se le conoce como segundo mensajero. El proceso que se lleva a cabo desde la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero se le conoce como transducción (1). La difusión de los segundos mensajeros permite que la señal se propague por toda la célula para regular procesos fisiológicos y bioquímicos (2).

Dado que el número de segundos mensajeros es pequeño, las rutas de transducción en las células son universales (2).

2. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL HORMONAL.

Existen varios sistemas de señalamiento transmembranal para

procesar las señales hormonales. Entre los más importantes están: a) el sistema de la adenilato ciclasa; b) el de fosfoinositidos calcio; c) el de los receptores acoplados a la guanilato ciclasa; d) el de receptores tirosina cinasa y e) el de receptores - canal (2). A continuación se hace una descripción del sistema de la adenilato ciclasa que es el que se analizará en este trabajo.

2.1 Sistema de la adenilato ciclasa sensible a hormonas

El sistema de la adenilato ciclasa (AC) es el más ampliamente estudiado. Su esclarecimiento se inició en 1958 cuando Sutherland y Rall descubrieron el adenosin 5'3' monofosfato cíclico (AMPC) y observaron la modulación de sus niveles en respuesta a la acción hormonal (24). En 1971 Rodbell y col. (24,30) descubrieron que el GTP resultaba esencial para el mecanismo de transducción que genera el AMPC, y por lo tanto demostraron la presencia de una proteína transmisora que une nucleótidos de guanina llamada ahora proteína G (2).

Este sistema que emplea AMPC como segundo mensajero posee receptores estimuladores (Rs) e inhibidores (Ri), ambos se comunican con la enzima amplificadora AC a través de transductores estimuladores e inhibidores, conocidos como Gs y Gi respectivamente (2,6-8). Los tres componentes protéicos parecen ser escasos y exclusivamente intrínsecos de la membrana (9) (Fig 1).

La actividad de la AC sensible a hormonas se encuentra en casi todas las células de vertebrados así como en muchas especies de invertebrados. En algunos procariontes (bacterias) y raramente en vertebrados (testículo de rata), la enzima se

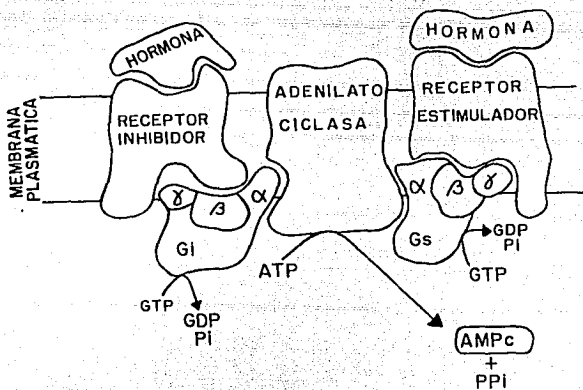


Fig. # 1. Sistema de la adenilato ciclase sensible a hormonas.

encuentra en el citosol (10). Dependiendo de la célula, esta puede ser estimulada por una o más hormonas (9).

2.1.1 Receptores

El receptor es una molécula con capacidad de reconocer e interactuar con el mensajero y de transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta celular (1,6,11,12).

Los receptores hormonales son glicoproteínas transmembranales con peso molecular elevado que oscila entre 60,000 y 90,000 daltones (9). Tienen una estructura tridimensional con formas diversas; algunos receptores, tales como la rodopsina (en el sistema visual), el de serotonina, el de dopamina, los β -adrenérgicos y los muscarínicos tienen estructura similar que consiste en 7 hélices transmembranales con regiones de homología en las asas citoplásmicas (7,13-16)(Fig 2). En la superficie de los receptores se encuentra el sitio de reconocimiento al que se une el mensajero. Las superficies del mensajero y del receptor se adaptan perfectamente entre sí y, esta perfecta adaptación de superficies es la base de la alta selectividad de los receptores para una hormona específica. La afinidad (K) entre la hormona y el receptor es una medida de la fuerza de adaptación entre las dos regiones complementarias y, puede ser definida como la constante de disociación en equilibrio (Kd), que es la concentración de la hormona que satura la mitad de los sitios de unión y cuyas magnitudes se encuentran usualmente entre 10^{-7} y 10^{-12} M (17) .

El sistema de la AC posee receptores estimuladores (Rs) e inhibidores (Ri). Los receptores estimuladores acoplados a la

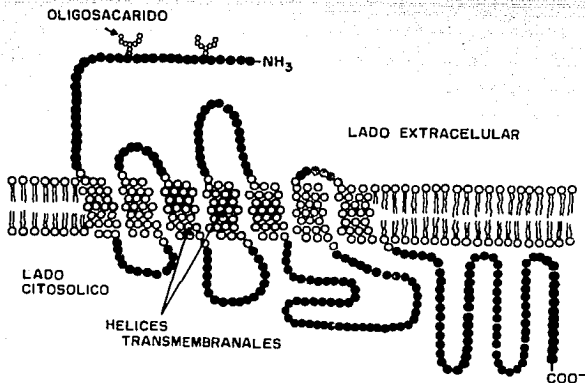


Fig. # 2 Plegamiento propuesto del receptor β adrenérgico. Los receptores tales como la rodopsina, receptores β adrenérgicos y muscarínicos tienen una estructura similar la cual incluye 7 hélices transmembranales y regiones de homología en las asas citoplásmicas. Una asa del lado citosólico participa en la activación de las proteínas G. La fosforilación de múltiples residuos de serina en el extremo carboxilo terminal evita la interacción del receptor con la proteína G. (15).

proteína G estimuladora (Gs) incluyen aquellos para agonistas β -adrenérgicos, gonadotropinas, PTH, AVP y otros; cuando estos receptores se estimulan, se activa la AC y se produce un aumento en las concentraciones intracelulares de AMPc. Los receptores inhibidores responden a agonistas α_1 -adrenérgicos, muscarínicos y opioides entre otros, inhiben a la AC por medio de la proteína G inhibidora (Gi) y por lo tanto disminuyen las concentraciones intracelulares de AMPc (11,12,18-20).

Los receptores, como ya se mencionó, comunican con proteínas reguladoras homólogas que unen nucleótidos de guanina, las llamadas proteínas G.

2.1.2 Proteínas G

Las proteínas G controlan la actividad catalítica de los sistemas enzimáticos por medio de una serie compleja de reacciones (18,21). Dichas proteínas, activadas por GTP poseen actividad GTPasa, lo cual hace de ellas relojes moleculares; esta capacidad impide la activación persistente de las proteínas G y regula el nivel de actividad de las funciones del efector (6,8,11,12,20-24). En el caso del sistema de la adenilato ciclasa, las proteínas Gs y Gi activan e inhiben respectivamente al efector (22,25).

Varias proteínas G acopladas a diferentes rutas de transducción han sido identificadas y clonadas. Dichas proteínas se encuentran enteramente en el lado citoplasmático de la membrana y comparten rasgos en común (12,14,20,23,24). Todas ellas son de naturaleza heterotrimérica, ya que están formadas por tres subunidades: las alfa, las beta y las gamma (α, β, γ).

Las subunidades α son únicas para cada proteína G (se han clonado 12), su tamaño varía de 39 a 52 kilodaltones (Kd), contienen el sitio de unión para el GTP; ahí, el GTP es hidrolizado por medio de la actividad de GTPasa inherente a dicha subunidad y además, contiene los sitios aceptores para la ADP ribosilación por la toxina pertussis y del cólera (PTX y CTX respectivamente). Las subunidades β de las cuales se han clonado 4, cuentan con un tamaño de 35 a 36 Kd y son muy parecidas en todas las proteínas G. Se han clonado 3 subunidades γ con un tamaño de 5 a 10 Kd, que parecen estar estrechamente asociadas con las subunidades β y pueden separarse de éstas solo en condiciones desnaturalizantes (6,11,12,20-24).

El arreglo exacto de las subunidades de las proteínas G no se conoce, pero se proponen tres posibilidades donde las subunidades $\beta\gamma$ sirven de anclaje para α en la membrana y, ésta última, siempre dá hacia la cara citoplasmática (14, 18) (Fig 3).

La identificación de las proteínas G ha sido posible gracias a la utilización de las toxinas bacterianas de Vibrio cholera y Bordetella pertussis, debido a que pueden modificar covalentemente a las proteínas G por incorporación de un grupo ADP ribosa a la subunidad α (14).

Se ha demostrado que todas las proteínas G con subunidades α que contienen un residuo de cisteína en la posición 4 del lado carboxilo terminal, son susceptibles de ADP ribosilación catalizada por la PTX. Debido a que en la subunidad α esta cisteína se reemplaza por una tirosina, Gs no puede ser ADP ribosilada por PTX. Por otra parte, todas las subunidades α -

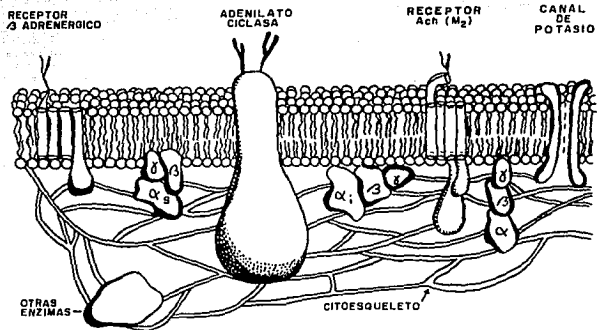


Fig. # 3 Vista esquemática de la organización de receptores, proteínas G y efectores en la membrana plasmática. Todos los receptores hasta ahora aislados son glicoproteínas transmembranales. La adenilato ciclasa es una enzima glicosilada transmembranal cuyos sitios activos están del lado citoplásmico de la membrana. Se muestra un canal muscarínico de potasio aunque su estructura aún no se conoce. Sin embargo, se sabe que otros canales iónicos son complejos multiméricos de proteínas. Se ilustran 3 posibles arreglos de las subunidades α y $\beta\gamma$ de las proteínas G, donde dichas subunidades pueden interactuar con el citoesqueleto (14).

que contienen arginina sirven como sitio aceptor para la ADP ribosilación catalizada por la CTX y se cree que, *in vivo*, Gs es el único sustrato de la CTX (11,22,26).

2.1.2.1 Proteína G estimuladora (Gs)

En 1980 se separó el componente responsable de la estimulación hormonal de la AC; dicho componente al que se le llamó Gs, es un complejo heterotrimérico compuesto de una subunidad α con peso molecular de 42 a 52 Kd, una subunidad β de 35 Kd y subunidades γ de 6 a 10 Kd (12,22-24). La proteína tiene función reguladora estimuladora dentro del sistema enzimático ya que se ha observado que en ausencia de Gs, la AC se encuentra inactiva aún en presencia del sustrato fisiológico Mg^{++} -ATP (18).

Gs, además de ser responsable de la activación de la AC, a través de su forma α_s -GTP, también es capaz de modular los estados de alta y baja afinidad de los receptores por el agonista. En presencia de Gs, más del 30% de los receptores están en su forma de alta afinidad por los agonistas, y en su ausencia, todos los receptores están en su forma de baja afinidad.

Por otra parte, debido a que el complejo $\alpha\beta\gamma$ es hidrofóbico, se piensa que Gs es una proteína periférica de membrana anclada en la hoja interna de la bicapa membranal a través de la subunidad γ (11,12,20,25).

2.1.2.2 Proteína G inhibidora (Gi)

Aunque muchos mensajeros actúan de manera estimuladora en el sistema de la AC, otros inhiben su acción. Lo anterior

sugirió la presencia de otra proteína reguladora con acción inhibitoria. La existencia de esta molécula que acopla los receptores hormonales inhibitorios a la AC, y que también requiere GTP, pudo ser demostrada en 1983 con la ayuda de la toxina pertussis. Las proteínas purificadas, una de hígado con subunidad α de 41 Kd, y la otra de células sanguíneas humanas con subunidad α de 40 Kd, fueron llamadas Gi. La PTX al ADP ribosilar la subunidad α ; impide la interacción de la proteína Gi con los receptores inhibitorios (Ri) y, como resultado, dicha proteína pierde su capacidad de inhibir a la enzima (3,6,11,12,23,27).

2.1.3 Unidad catalítica: adenilato ciclasa (AC)

La AC es una enzima transmembranal glicosilada cuyo sitio activo está sobre la cara citoplásmica de la membrana (18).

En 1974 Neer calculó para AC de rata un PM de 1.59×10^5 . Según este autor, la determinación de su volumen específico parcial, indica que la enzima renal tiene un área hidrofóbica mínima por lo que probablemente no penetra en la bicapa lipídica significativamente (9).

Otra característica propia de la AC es que manifiesta una actividad basal que varía de acuerdo al tejido y al procedimiento de ensayo. Aún no está claro si esto representa la verdadera actividad de la enzima no perturbada, o se deba a una ligera estimulación de la enzima, inicialmente inactiva, por ligandos reguladores (impurezas en la preparación de membranas, o en el ATP usado como sustrato). Dicha actividad basal puede aumentarse por la adición de hormonas apropiadas o análogos a la mezcla de

ensayo, pero de cualquier forma, el grado de activación hormonal ensayado in vitro es menor que el observado cuando se estudia la síntesis de AMPc en células intactas o en tejidos. Además, la concentración de hormona requerida por la enzima, aumenta después de la homogenización de tejidos (9).

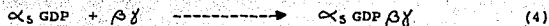
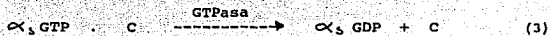
3. MODELOS PARA LA REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA AC.

3.1 Mecanismos de activación de las proteínas G

3.1.1 Modelo de disociación de G para la regulación de la AC por hormonas

La activación de la AC comienza con la unión de la hormona estimuladora (Hs) al receptor estimulador (Rs) para formar el complejo de alta afinidad HR que a su vez, activa a la proteína Gs al facilitar su cambio conformacional. En el estado de alta afinidad y bajo la influencia del Mg^{++} , Gs se vuelve afin al GTP natural (o a los análogos no hidrolizables), el cual se une estrechamente a la subunidad α_s , y se libera a su vez GDP; esto resulta en la disociación del receptor del complejo y en la disociación de Gs en α_s -GTP y el complejo $\beta\gamma$ (ecuación # 1) (2,3,10,12,24,28-30,33). A este estado de la proteína G se le conoce como activación (estado en el cual la proteína G es capaz de estimular o de inhibir la actividad de la AC) (18,25). Por su parte, el receptor regresa a su estado de baja afinidad, lo que permite la disociación de la hormona (2,3,5,10,24,30). La subunidad α_s -GTP activa que se liberó del heterotrímico, se combina con la unidad catalítica AC para formar el complejo α_s -GTP.C. La AC bajo la acción directa de α_s -GTP se activa a la forma productora de AMPc a partir del sustrato ATP (ecuación

#2), mientras que por otra parte, las subunidades $\beta\gamma$ compiten con C para reasociarse con α_s (12,24,28-30,33). El AMPc así generado se une al componente regulador de una proteína cinasa A y al quedar libre la porción catalítica fosforila proteínas que finalmente dan la respuesta celular (2,5,12,28,29). Posteriormente, el AMPc es degradado por una fosfodiesterasa específica la cual lo hidroliza hasta AMP, con lo que termina su acción sobre la proteína cinasa A ($\text{AMPc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{AMP} + \text{H}^+$) (5,31). Finalmente, cuando la GTPasa hidroliza GTP del complejo $\alpha_s\text{-GTP}\cdot\text{C}$ para formar $\alpha_s\text{-GDP}\cdot\text{C}$, el complejo se disocia en $\alpha_s\text{-GDP}$ y C, y $\alpha_s\text{-GDP}$ se recombina con $\beta\gamma$ para volver a formar la proteína Gs inactiva (ecuaciones 3 y 4) (2,5,12,24,28,30). Un nuevo ciclo de activación de Gs por la hormona estimuladora puede comenzar ahora. De acuerdo a este modelo, la concentración intramembranal de las subunidades $\beta\gamma$ determina el nivel de actividad de la AC, ya que estas compiten con el catalizador C por $\alpha_s\text{-GTP}$ (Fig 4 A) (3,24).



Se sabe que en ausencia de HR, la reacción #1 requiere de una alta concentración de Mg^{++} (3).

Por otra parte, el mecanismo de inhibición de la AC es controversial, debido a que existen evidencias para al menos dos

Fig. A

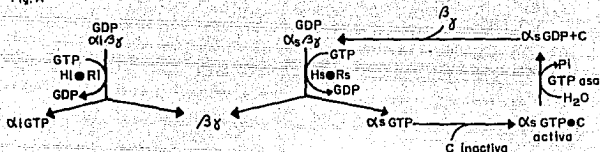


Fig. B

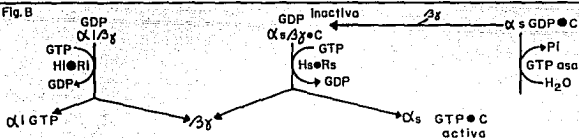


Fig. # 4 A. Modelo de disociación de G para la regulación de la adenilato ciclasa por hormonas. La estimulación de la ciclasa ocurre de la siguiente manera: El agonista (Hs) unido al receptor estimulador (Rs), cataliza el intercambio GDP-GTP en G_s , y G_s se disocia en $\alpha_5 \text{ GTP}$ y $\beta \gamma$. La $\alpha_5 \text{ GTP}$ se une al catalizador adenilato ciclasa (C) y lo activa: La GTPasa hidroliza al GTP y la $\alpha_5 \text{ GDP}$ se disocia de C y se reasocia con $\beta \gamma$ para formar el heterotrímero. Un nuevo ciclo de activación de G_s por la hormona estimuladora puede empezar ahora. La inhibición de la AC ocurre cuando el agonista (Hi) se une al receptor inhibidor (Ri) y este cataliza el intercambio GDP-GTP y entonces G_i se disocia en GTP y $\beta \gamma$. Las subunidades $\beta \gamma$ liberadas elevan su nivel dentro de la bicapa causando una inhibición de la ciclasa.

Fig. # 4 B. Modelo de disociación modificado de G para la regulación de la adenilato ciclasa por hormonas. En este modelo se asume que la subunidad α está físicamente unida al catalizador C todo el tiempo. La forma activa de la enzima es $\alpha_5 \text{ GTP} \cdot \text{C}$ y su forma inactiva es $\alpha_5 \beta \gamma \cdot \text{C}$. Como en el modelo de disociación anterior; la concentración intramembranal de las subunidades determinan el nivel de actividad de la ciclasa (28).

mecanismos distintos: primero, la subunidad α de G_i puede inhibir directamente a la unidad catalítica, y segundo, la liberación de grandes cantidades de subunidades $\beta\gamma$ de G_i pueden, por acción de masas, asociarse con las subunidades α_s libres y evitar la estimulación de la AC. Es probable que la combinación de ambos mecanismos explique las propiedades inhibitoras en la activación de G_i (8).

Las dos características básicas del modelo son :

i) Los cinco componentes: R_s , R_i , G_s , G_i y C están físicamente separados e interactúan unos con otros.

ii) La forma nativa de la enzima es C , mientras que su forma activa es α_s GTP.C.

Este modelo molecular tiene gran importancia principalmente por dos características: le otorga un papel funcional a la subunidades $\beta\gamma$ y, a causa de la identidad de estas en G_i y G_s , se logra una comunicación cruzada entre ambas proteínas G , que permite la inhibición de la AC por G_i sin interacción directa G_i/C (11,12,23,24,28,34) (Fig 4A)

Los estudios de la cinética de activación de la AC por hormonas y nucleótidos de guanina, tanto en membranas nativas como en sistemas reconstituidos, proponen que dicha cinética es de 1er orden, debido a que se observa una dependencia lineal entre la activación de la AC y la concentración del receptor activo (28). En consecuencia, se propuso una modificación del modelo de disociación analizado, en el cual, la unidad funcional del sistema de la AC es un complejo entre G_s y C . De acuerdo a este modelo se piensa que α_s está siempre asociada con C (físicamente unidos) y que las subunidades $\beta\gamma$ se disocian del

complejo Gs.C dejando libre α_s .C. En este caso, la forma activa de la enzima es α_s GTP.C. También en este modelo, la concentración intramembranal de las subunidades $\beta\gamma$ determina el nivel de actividad de la AC. Además, la disociación incompleta de α y C permite explicar la cinética de activación (28) (Fig 4B).

4. ORGANIZACION DE LOS COMPONENTES DEL SISTEMA EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA

4.1 Modelo de libre disociación

El modelo propone que todos los componentes del sistema de la AC pueden flotar libremente en la membrana. Es decir, cualquier subunidad de las proteínas G puede unirse a cualquier receptor o efector si tiene la especificidad estructural adecuada.

Existen observaciones que sugieren que algunos componentes se mueven realmente en la membrana. Por ejemplo, el sistema de la AC sensible a hormonas puede reconstituirse por fusión de células que tengan ya sea receptores o unidad catalítica; esto prueba que los componentes de los dos tipos celulares debieron haber difundido en el plano de la membrana plasmática. Por otra parte, no existen evidencias directas de que la separación de las subunidades de G ocurra en la membrana, pero dos experimentos indirectos indican que la disociación puede llevarse a cabo. Por ejemplo, las subunidades $\beta\gamma$ en exceso pueden inhibir a la AC en membranas, esto sugiere que $\beta\gamma$ se asocia con α_s que se encuentra en la membrana, y cambia de este modo el equilibrio de dicha subunidad. Además, se ha observado que α^p pura, es capaz de activar a la AC de membranas de plaquetas y de células S49, debido probablemente a que α^p se une a las subunidades $\beta\gamma$ que

se encuentran libres y que son causantes de la inhibición del sistema. En este modelo, la estequiometría de los receptores, proteínas G y efectores, es extremadamente importante para determinar su especificidad (14).

4.2 Modelo de disociación restringida

Con el fin de asegurar la especificidad de acción de las proteínas G, este modelo restringe la localización de los componentes del sistema de la AC. En otras palabras, dentro de un Área limitada, las subunidades pueden disociarse, pero no difundir libremente a través de la membrana. En apoyo a esta teoría, existen evidencias que sugieren que el citoesqueleto influye en la habilidad de las hormonas para estimular a la AC y, parece ser, que las subunidades γ se encuentran asociadas a dicho citoesqueleto.

Ambos modelos no son mutuamente excluyentes y, cada uno puede aplicarse a diferentes partes de la célula. Un argumento en contra del modelo de libre disociación, podría ser el hecho de que en algunas células, los receptores particulares y las proteínas G, se encuentran segregadas en una superficie particular, más bien en la apical que en la basolateral. Esta localización se ha observado en algunas células epiteliales, del mismo modo que se ha observado que la AC sensible a hormona paratiroidea, se encuentra preferentemente en la superficie basolateral de las células renales corticales (14).

Por otra parte, los mecanismos descritos para la activación de la AC sugieren que tanto la enzima, como las proteínas G y los receptores, se encuentran flotando en la bicapa lipídica; sin

embargo, como ya se mencionó, no está clara su absoluta libertad de movimiento (9). Es importante mencionar que los componentes de este sistema enzimático sufren cambios conformacionales críticos que sugieren una importante interacción con ciertos lípidos presentes en la membrana (3).

5. PAPEL DEL MAGNESIO (Mg^{+2}) EN EL SISTEMA DE LA AC.

Se conocen estudios que indican que la afinidad por Mg^{+2} en el sistema de la AC aparentemente está relacionada con la proteína G, la cual requiere de dicho catión para la activación por GTP (4,11,35). Además, la estabilización de Gs activa se logra por la adición de Mg^{+2} (4) y, a altas concentraciones de éste, la proteína G puede activarse incluso sin la acción del complejo hormona-receptor. Por otro lado, se sabe que el Mg^{+2} también afecta a G aún en ausencia de nucleótidos de guanina; se cree que esto se debe a que el Mg^{+2} provoca un aumento en la afinidad del receptor por el agonista y realiza la unión del complejo H-R-G (3).

6. ANALOGOS NO HIDROLIZABLES DE GTP: Gpp(NH)p y GTP γ S.

Como ya se explicó, la estimulación hormonal de la AC requiere, además del sustrato, la presencia de un nucleótido de guanina (GTP). Se han descubierto análogos de GTP, por ejemplo el Gpp(NH)p y el GTP γ S, que tienen la habilidad de interactuar con los sitios específicos para el GTP, son relativamente resistentes a la hidrólisis del fosfato modificado, y son cuantitativamente más efectivos que el GTP en la estimulación de la AC (10). Los análogos GTP γ S y Gpp(NH)p, activan a la AC por tiempo persistente inclusive después de que se eliminan los

ligandos estimuladores (4), y también pueden estimular su actividad en ausencia de hormonas (11). Se cree que el Gpp(NH)p y el GDP compiten por el mismo sitio de unión en la proteína G (3). Debido a que el Gpp(NH)p es isoeléctrico y probablemente isoestérico a GTP, se asemeja más al GTP que el GTP δ S excluyendo, por supuesto, la reacción de cierre de la GTPasa, la cual está ausente en las proteínas G activadas con Gpp(NH)p (28).

7. PROCESOS DE DESACTIVACION EN EL SISTEMA DE LA AC.

En este sistema se conocen tres procesos de desactivación:

7.1 Activación de la guanosin trifosfatasa (GTPasa) mediante R_s

Esta reacción desactiva a α_s -GTP por hidrólisis lenta del GTP estrechamente unido: $GTP \xrightarrow{GTPasa} GDP + Pi$. Parece ser que la actividad hidrolítica se encuentra inherente en todas las proteínas G (3). Una vez que las proteínas G han hidrolizado GTP, la mayoría de ellas retienen unido GDP, con lo cual regresan a su estado inactivo (22,25,28).

7.2 Desensibilización y regulación a la baja del receptor

La activación de las proteínas G mediante los receptores no depende únicamente de la unión de la hormona, debido a que las moléculas receptoras expuestas a un nivel constante de hormona por un período extenso, ya no catalizan de manera efectiva el intercambio GTP - GDP. La consecuente disminución en la actividad de la AC se conoce como desensibilización o adaptación (3,15,36,37).

Por otro lado, la desensibilización conduce a una regulación a la baja, que consiste en la desaparición de los receptores de la membrana, proceso que también se realiza por la unión de un

agonista. Se ha demostrado así mismo, que durante este proceso de desactivación, los receptores permanecen localizados en la luz de vesículas que se forman por endocitosis, donde además, no sufren cambios irreversibles en su estructura molecular (3,15,37).

7.3 Desactivación a través de la acción de agonistas inhibidores

La acetil colina, los opiáceos y la noradrenalina, son algunos agonistas que causan la inhibición de la AC (3).

Según Gilman (18) la inhibición se debe, al menos en parte, a la secuencia de reacciones siguiente:



Como ya se mencionó, las subunidades $\beta\gamma$ de Gs y Gi son muy similares, por lo que al acumularse un exceso de estas se produce una comunicación cruzada entre ambas proteínas, lo que ocasiona que la concentración de $\alpha_s\text{GTP}$ disminuya dado que el aumento en la concentración de $\beta\gamma$ conduce a su reasociación con α_s y, por lo tanto, a la desactivación del sistema (particularmente en ausencia relativa de nucleótidos de guanina y de Mg^{+2}) (3,18).

Actualmente no se sabe si este mecanismo de inhibición opera en todos los sistemas. Es importante saber si las subunidades $\beta\gamma$ reprimen la actividad de todas las subunidades α_s , pues si en todos los sistemas de transducción de señal, solo las subunidades α_s libres son activas, entonces la concentración de las subunidades $\beta\gamma$ en toda la membrana juega un papel crucial en la determinación neta de cualquier señal individual (22).

En cuanto a la subunidad α_1 , se sabe que puede inhibir directamente a la unidad catalítica, o estando aislada, puede estimular la actividad de la AC gracias a su capacidad de unirse al complejo $\beta\gamma$ (18).

8. TOXINA PERTUSSIS

Como ya se mencionó, el conocimiento de las proteínas G y su relación con los demás componentes del sistema de la AC, ha sido posible, en gran parte, a la utilización de valiosas herramientas como son las toxinas de Vibrio cholera y Bordetella pertussis, las cuales ADP ribosilan la subunidad α_1 y α_2 de las proteínas G respectivamente. La ADP ribosilación es un proceso que modifica covalentemente a las proteínas mediante la incorporación de un grupo de ADP ribosa y que utiliza NAD como sustrato (12,22,26,27,38-41).

Cuando la toxina pertussis ADP ribosila la subunidad α_1 impide el acoplamiento de G_i a los receptores inhibidores, que da como resultado la estabilización de dicha proteína en el estado inactivo y, en consecuencia, se bloquea la comunicación entre G_i y la unidad catalítica de la AC (12,26,27,41).

9. HORMONA PARATIROIDEA

La hormona paratiroidea (PTH) es un polipéptido de cadena sencilla que contiene 84 aminoácidos (aa) exentos de cisteína, y que se sintetiza en las glándulas paratiroides en respuesta a una disminución del calcio ionizado en el líquido extracelular (17,42,43).

9.1 Biosíntesis

La PTH se forma a partir de un precursor biosintético, la

preproPTH que tiene 115 aa y que da primero origen a la proPTH que tiene 90 aa. La proPTH se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso de las células principales en las glándulas paratiroides y se convierte a PTH por rompimiento proteolítico en el aparato de Golgi. La PTH 1-84 se almacena en gránulos secretorios que pueden permanecer dentro de la célula, o ser transportados a la periferia de la membrana plasmática y liberarse por exocitosis al fluido extracelular en respuesta al estímulo apropiado (42,44).

9.2 Secreción

El calcio es el principal regulador de la actividad glandular paratiroidea. La tasa de secreción de PTH es inversamente dependiente de la concentración intracelular del ión calcio, por lo que una disminución en el calcio sérico ionizado tan pequeña como 0.1 a 0.2 mg/dl constituye un importante estímulo para la secreción (42 - 45). Por otro lado, debido a que la PTH aumenta la concentración de calcio en el líquido extracelular (LEC) a través de sus efectos en el hueso, riñón e intestino, una inhibición por retroalimentación negativa de la glándula paratiroides contribuye a regular las concentraciones de calcio del LEC dentro de límites estrechos (43,44,45).

Parece que el aumento de la secreción de PTH causada por la disminución en la concentración de calcio circulante, está mediada por un aumento en el AMPc intracelular, debido a que un aumento en los niveles intracelulares de AMPc inducen la secreción de la hormona. Esto sugiere que la formación de AMPc está relacionada con el proceso de exocitosis en la glándula

paratiroides (43,44).

Aunque el calcio es el catión principal que influye en la secreción de PTH, el magnesio puede ocasionar cambios similares pero sólo a concentraciones varias veces más altas que las que se encuentran en el LEC bajo condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, se sabe que en condiciones de hipermagnesemia se suprime y en hipomagnesemia se eleva la concentración de PTH (42,44).

9.3 Metabolismo de la PTH

El riñón, el hígado y el esqueleto son los sitios principales para la degradación de la PTH. El hígado extrae selectivamente de la circulación hormona intacta pero no sus fragmentos; los riñones extraen tanto hormona intacta como sus fragmentos y, por último, el hueso presenta una captación selectiva de PTH 1-34 (42,44).

9.4 Acciones biológicas

A través de sus principales acciones sobre el riñón y el hueso (y sus efectos sobre el intestino), la PTH es responsable de la regulación minuto a minuto de los niveles de calcio en la sangre y en el LEC. La PTH actúa sobre el riñón para aumentar la reabsorción de calcio y disminuir la reabsorción de fosfato. En el esqueleto, la estimulación por PTH conduce a la reabsorción del hueso y a la liberación subsecuente de calcio y fosfato a la circulación. A través de su efecto sobre la 1α hidroxilasa renal, la PTH estimula la formación de $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D la cual tiene a su vez efectos biológicos directos sobre el intestino; el resultado es un aumento de la eficiencia en la

absorción de calcio de la dieta.

La PTH interactúa con receptores hormonales específicos sobre la membrana plasmática en las células de los tejidos blanco. Esto inicia una cascada de eventos intracelulares tales como la fosforilación de proteínas específicas por las cinasas, la entrada de calcio a la célula y la activación de enzimas. Lo anterior tiene consecuencias metabólicas intracelulares y extracelulares (43,44).

9.5 Efectos de la PTH sobre el riñón

La PTH tiene diversas acciones en múltiples sitios a lo largo de la nefrona y, su principal papel es aumentar la reabsorción de calcio en los sitios corticales de la porción tubular distal de la nefrona, aunque la hormona también bloquea la reabsorción de sodio, calcio, fosfato y bicarbonato en el túbulo proximal (43,44) (Fig 5).

9.5.1 Adenilato Ciclasa y AMPc

A nivel celular, la actividad de la AC estimulada por PTH se encuentra en la posición basolateral de las células tubulares renales adyacentes a los capilares renales. Al parecer, el AMPc generado mediante la estimulación por PTH en el lado basolateral de la célula, migra a través del citoplasma para activar a las cinasas dependientes de AMPc las cuales, a su vez, activan enzimas responsables del transporte iónico (43,44,46).

9.5.2 Manejo del Fosfato

Una de las acciones renales mejor conocidas de la PTH es el efecto fosfatúrico. La PTH disminuye en el túbulo proximal y distal la reabsorción de fosfato, lo que conduce a un aumento en

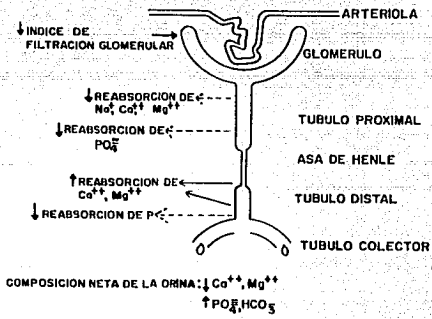


Fig. # 5 Efecto de la PTH sobre los túbulos renales. (43)

su excreción fraccional (42) .

En términos de homeostasis del fosfato, cuando la PTH produce reabsorción ósea, se liberan el calcio y el fosfato; de manera similar, su efecto intestinal (ejercido a través de la vitamina D) aumenta la absorción de calcio como la de fosfato. En consecuencia, mientras que la disminución de calcio, que desencadena el aumento de la PTH, se compensa homeostáticamente, el fosfato plasmático aumenta por encima de lo normal, lo que no sucede debido a la inhibición de la reabsorción tubular de fosfato que produce la hormona paratiroidea. Este efecto es tan potente que se ve, en general, que la concentración de fosfato plasmático disminuye cada vez que los niveles de PTH aumentan (47).

9.5.3 Manejo del Calcio

En los túbulos proximales, la administración de PTH disminuye la reabsorción de calcio en paralelo con una disminución en la reabsorción de sodio. Este paralelismo es roto en la nefrona distal, donde la PTH aumenta la reabsorción de calcio sobre la reabsorción de sodio, lo que resulta en una disminución neta de la depuración de calcio.

9.5.4 Otros efectos renales

Aunque la mayoría de las respuestas bioquímicas a la PTH en los túbulos renales o en las células renales in vitro están asociadas con aumentos en el AMPc, algunas consecuencias metabólicas probablemente son mediadas por calcio, debido a que se ha observado que los niveles intracelulares de calcio en las células renales in vitro, aumenta como resultado de la estimulación por PTH (5,44).

9.6 Mapa funcional de la molécula hormonal

Se han hecho estudios de estructura/actividad en donde se han utilizado fragmentos sintetizados químicamente y análogos de la PTH, para obtener detalles de los requerimientos estructurales necesarios para su interacción con el receptor y la generación de AMPc. Se sabe que en las posiciones 1 a la 34 se encuentran todos los requerimientos estructurales necesarios para su completa actividad biológica. En sistemas de ensayos múltiples; esta región ha sido sintetizada y es casi tan potente como la PTH nativa *in vitro* e *in vivo*. También la unión de la PTH (1-34) a los receptores de membrana renales es igual a la unión de la PTHb (1-84) (Fig 6).

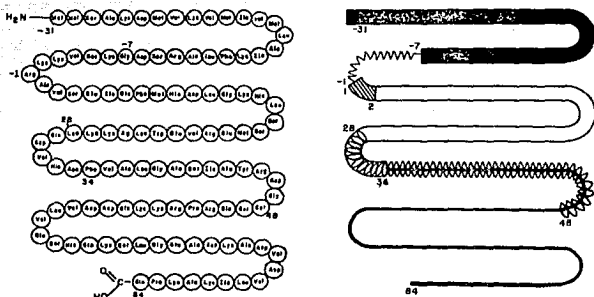


Fig. # 6 Mapa funcional de la hormona paratiroidea. La secuencia completa de aminoácidos de la hormona preproparatiroidea bovina se muestra a la izquierda. Las regiones de la secuencia primaria son marcadas de acuerdo a sus funciones fisiológicas a la derecha. La línea sólida ancha indica la secuencia líder (posiciones -31 a -7). La región dentada es el hexapéptido específico de la hormona preparatiroidea (posiciones -6 a -1). La porción completamente activa comprende las posiciones 1 a 34. Las posiciones 1 y 2 (en rayas) son esenciales para la activación y las regiones 3 a 34 (en blanco) contienen los determinantes estructurales necesarios para la unión con el receptor. La región (posiciones 28 - 48) reconocida por enzima(s) que metabolizan la hormona es mostrada por la espiral. La línea marca los sitios principales del rompimiento de la hormona in vivo. La secuencia COOH inactiva (posiciones 34 - 84) se indica por la línea sólida delgada (44).

II ANTECEDENTES

La preparación de membranas basolaterales de corteza renal canina enriquecidas en adenilato ciclasa sensibles a PTH, ha demostrado ser una herramienta que permite conocer la participación de cada uno de los elementos del sistema: receptores (Rs y Ri), proteínas G (Gs y Gi), enzima amplificadora (AC) y cationes divalentes (Mg^{++}). Existen estudios de este sistema bajo diferentes condiciones como son : desensibilización a PTH in vivo o in vitro, depleción de fosfato y acidosis metabólica (72). Previos trabajos (67) han reportado la influencia de la forskolina en el sistema de la AC. Sin embargo, la información que existe se refiere fundamentalmente a agonistas y antagonistas de Gs, y a la participación de la toxina del cólera como activador permanente de Gs. Aunque existe evidencia de la presencia de Gi en estas membranas dada por experimentos de ADP ribosilación con PTX (35,71), y su identificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, la participación funcional de Gi en la regulación de este sistema no se conoce con claridad. Se han reportado trabajos, por ejemplo el del cultivo de células renales de zarigueya, en donde la ADP ribosilación con PTX indujo un aumento en la producción de AMPc en respuesta a PTH, en comparación con las células controles que no se encontraban ADP ribosiladas (73). Lo anterior sugiere que ambas proteínas G (Gs y Gi) modulan la acción de la PTH en este sistema celular (70).

Por lo tanto, ante la evidencia de que las proteínas G participan en la transducción del mensaje a través de las membranas, demostrar si los efectos de G_i se manifiestan en la actividad catalítica de la AC, resulta un campo de mucha importancia para comprender el sistema de transducción de la AC.

III. HIPOTESIS

En el sistema de la adenilato ciclasa sensible a hormona paratiroidea de membranas basolaterales de corteza renal canina existen tanto proteínas Gs como Gi y ambas participan en el proceso de activación del efector.

IV OBJETIVOS

1) Disponer de las técnicas necesarias para el estudio del sistema de la AC sensible a PTH (sistema de transducción hormonal) aislado de membranas basolaterales de corteza renal canina.

2) Valorar la funcionalidad del sistema mediante su estimulación a diferentes niveles.

3) Evaluar la presencia y la actividad del componente inhibitorio del sistema de la AC sensible a PTH, de membranas basolaterales de corteza renal canina mediante:

a) Identificación directa de la proteína Gi por ADP ribosilación con PTX y NAD-³²P por electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía.

b) El efecto del GTP y GTPγS en el sistema:

i) En ausencia de agonistas

ii) Estimulando con PTH

iii) Estimulando con forskolina

c) Inhibición de Gi mediante ADP ribosilación con PTX

i) Con el sistema activado con PTH, GTP y GTPγS

ii) Con el sistema activado con forskolina.

V MATERIAL Y METODOS

Con el propósito de evidenciar la presencia del componente inhibidor de la AC en membranas basolaterales de corteza renal canina, se llevó a cabo el siguiente trabajo experimental, cuya realización fué posible mediante el uso del material y los métodos que a continuación se describen:

1. Materiales

1.1 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA): 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina, sal disódica (AMPC); clorhidrato de tri-hidroximetil aminometano (tris-HCl); cloruro de magnesio hexahidratado; sacarosa cristalina (de caña de azúcar); 3 isobutil-metil-xantina (IBMX); adenosin 5'trifosfato; dinucleótido fosfatado de nicotinamida y adenina (β -NADP) tetrahidratado; nicotinamida adenina dinucleótido anhidra (β -NAD); azul brillante de Coomassie G anhidro; timidina; dl-ditiotreitól anhidro (DTT); albúmina sérica de bovino (ASB); fosfocreatina y creatinfosfoquinas (EC 2.7.3.2). Los reactivos: etilendinitrilotetracetato disódico dihidratado (EDTA); sulfato de amonio; acetato de sodio trihidratado; hidróxido de sodio; éter anhidro y ácido fosfórico, fueron adquiridos de J.T. Baker, S.A. (Xalostoc, México). El cloruro de potasio fué de Merck de México; el pentobarbital sódico fué de Smith Kline Norden de México y; los amortiguadores de referencia pH 7.38 ± 0.01 y 6.0 ± 0.02 , fueron de Sigma de México. La hormona paratiroidea bovina sintética 1-34 (PTHb 1-34) se obtuvo de Península

Laboratories (USA); el anticuerpo RB-1 contra AMPc así como el suero canino hipoparatiroideo, fueron donados por el Dr. Eduardo Slatopolsky (División Renal de la Escuela de Medicina de la Universidad de Washington, San Louis Missouri); la inmunoglobulina G (IgG) de humano, fué preparada en el Depto. de Nefrología y Metabolismo Mineral del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INN SZ); el AMPc ^{125}I (monosuccinil-tirosil-metil-éster del AMPc Iodo 125), se marcó en el laboratorio del mismo Depto. de acuerdo al método de Steiner y cols. (48); la toxina pertussis, aislada de un concentrado de vacuna por el método de Sekura y cols. (49), fué un generoso donativo del Dr. J. Adolfo García Sainz (Depto. de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

1.2 Equipo

Contador Gamma Automático 4/200 Macc II de Micromedic Systems, INC; centrifuga refrigerada IEC-PR-6000, rotor 253 y 259, Damon/Iec Division; microcentrifuga 12 "Technical Support" 174 t; centrifuga de alta velocidad J2 - 21, rotor JA 20.1; ultracentrifuga L5 - 50B, rotor SW40 Ti 3474 de Beckman; espectrocolorímetro Spectronic 20 de Bausch & Lomb; purificador de agua Millipore "Milli Q" AB 15067N de Universal Electric Co; Congeladores REVÇO de -70 y -35 °C, potenciómetro digital 601 de Orion Research; balanza de equilibrio Harvard trip 1450 de Ohaus; balanza analítica H-1b de Mettler; fisiógrafo MK - IV con electro-esfingmomanómetro programable PE-300 de Narco Biosystems; baño con agitador (-10 a 110 °C) de Group Precision Scientific Corporation (GCA); baño de ebullición (15 a 120 °C) de J.M.

Ortiz; agitador Eberbach Corporation Ann. (Mich.); agitador magnético MAG-MIX de Precision Scientific Co; vortex J. R. Mixer K-500J de Scientific Industries; vortex Deluxe Mixer S8220 de Scientific Products; rasuradora eléctrica Oster 22; bomba peristáltica LKB-Bromma 2115 de H.J. Guldener (Suiza); jaula inmovilizadora "Econa Cage" para ratas medianas de 150 a 300 g de Thomas Scientific; macerador tisular de vidrio-teflón con cubierta refrigerante C 137 J de Arthur H. Thomas Company (USA); malla de nylon con poro de 200 Å de Thomas C.O. (USA); micropipetas Gilson P20, P200 y P5000 de Rainin Instrument C.O. Inc; repipeteador Gilson J-79-10081 R 200; repipeteador II de Labindustries; jeringa dispensora PB 600 de Hamilton C.O. (Reno Nevada, USA); celdillas para espectrocolorímetro de 12.5 pulgadas Milton Ro and Company; equipo de cirugía; navaja de microtomo "Steel Blades" de 0.5 mm de Thomas Scientific.

1.3 Soluciones

Solución salina isotónica de Laboratories PISA (México); todas las demás soluciones se prepararon en el laboratorio con agua bidestilada y desionizada.

1.4 Animales de experimentación

En este trabajo se usaron ratas macho (Rattus norvegicus) de la cepa Wistar criadas y mantenidas en el Bioterio del INN SZ alimentadas ad libitum, con peso promedio de 150 a 200 g y, con una edad de 5 semanas; 9 perros mestizos alimentados ad libitum, con peso promedio de 15 Kg y con edades menores a 5 años tomados al azar del Bioterio del INN SZ.

2. Métodos

2.1 Aislamiento de membranas basolaterales de corteza renal canina

El aislamiento de membranas sensibles a PTH se realizó según el método de Ebel y cols. (50) con algunas modificaciones (51). Los riñones, obtenidos de perros anestesiados con pentobarbital (30 mg/Kg I.V.), fueron perfundidos con solución salina fría (4 °C) hasta eliminar la sangre residual (todos los pasos siguientes se realizaron a 4 °C). Una vez perfundidos los riñones, se les retiró la cápsula renal, se seccionaron longitudinalmente y se disecó la corteza de la médula. La corteza así separada fué macerada finamente, se hicieron bloques de tejido de 5 g y, se procedió a homogenizar cada bloque en 5 veces su peso en volumen con solución amortiguadora de homogenización (250 mM de sacarosa, 20 mM de tris HCl, 1 mM de EDTA, pH 7.6) y con un homogenizador de vidrio-teflón. Se aplicaron 6 golpes con el macerador tisular a 35 ciclos/min y 25 golpes a 60 ciclos/min. El homogenado se filtró a través de una malla de nylon y se separaron los fragmentos por centrifugación diferencial: se centrifugó dos veces a 700 x g durante 10 min. en una centrifuga refrigerada; el precipitado se desechó y el sobrenadante se centrifugó a 1350 x g durante 10 min. El precipitado se desechó y el sobrenadante que contenía membranas plasmáticas, pequeñas mitocondrias y microsomas (datos obtenidos de la literatura (10)), se centrifugó a 2500 x g durante 20 min. El sobrenadante resultante se desechó y el precipitado se resuspendió en amortiguador de homogenización en proporción de

1:5, se rehomogenizó con 5 golpes manuales y se centrifugó a 2500 x g durante 20 min. Este paso se realizó 2 veces. El precipitado final, que contenía una preparación de membranas plasmáticas crudas contaminadas con mitocondrias y retículo endoplásmico, se resuspendió en el amortiguador de homogenización, se rehomogenizó con 10 golpes manuales y se colocó sobre gradientes discontinuos de sacarosa. Los gradientes de sacarosa se empaquetaron en tubos de ultracentrifuga con ayuda de una bomba peristáltica en el siguiente orden (de mayor a menor densidad): 3 ml de sacarosa al 39%, 4 ml al 37%, 2 ml al 36% y 2 ml al 32% (p/p) preparados en "amortiguador de lavado": 10 mM de tris HCl, 1 mM de EDTA a pH 7.6. El homogenado se ultracentrifugó a 23000 rpm durante 90 min (rotor SW 40 Ti 3474). Mediante la ultracentrifugación se obtuvieron bandas de proteínas en cada una de las interfases de sacarosa; sin embargo, debido a que experimentos preliminares indican que la unión altamente específica de la PTH y la mayor actividad de la AC se encuentran presentes en las bandas de las interfases de 32 y 36%, sólo estas bandas fueron colectadas de cada tubo. Las bandas conseguidas se diluyeron hasta la isotonicidad con amortiguador de lavado, se rehomogenizaron con 5 golpes manuales y se recolectaron por centrifugación a 17000 x g durante 20 min. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en amortiguador de homogenización y, la concentración de proteínas de membrana se ajustó a 1 µg/µl por el método de Bradford (52). Finalmente, las alícuotas se almacenaron a -70°C para su uso posterior.

2.2. Cuantificación de Proteínas

Para ajustar la concentración de proteínas de membrana a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se empleó el método de Bradford (52). El método es un ensayo de unión a un colorante basado en el cambio diferencial en el color del colorante en respuesta a diversas concentraciones de proteínas. El principio del método se basa en la observación de que la absorbencia máxima de una solución ácida de azul brillante de Coomassie G 250 se desplaza de 465 nm a 595 nm cuando se une a proteínas. El ensayo es muy reproducible y rápido, con el proceso de unión del colorante virtualmente completo en aproximadamente 2 min. y con una buena estabilidad del color por 1 hora.

Las soluciones empleadas fueron:

a) Solución patrón de proteínas: se preparó una solución "stock" de albúmina sérica de bovino (ASB) con una concentración de 100 mg/dl, a partir de la cual se construyó la curva patrón de proteínas (100, 80, 60, 40, 20 y 10 mg/dl).

b) Reactivo Bradford: se disolvieron 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%. A esta solución se le adicionaron 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v). La solución resultante se ajustó a un volumen final de 1 litro con agua destilada y desionizada. Las concentraciones finales de los reactivos fueron: 0.01% de azul brillante de Coomassie G-250, 4.7% de etanol y 8.5% de ácido fosfórico.

El procedimiento para la cuantificación fué el siguiente: se midieron 100 μl de las soluciones patrón de proteínas y de las muestras (que contenían de 10 a 100 μg de proteína). A cada

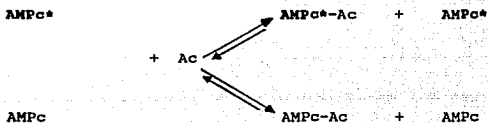
tubo se le adicionaron 5 ml de reactivo Bradford y se agitó el contenido con un vortex. La absorbencia se midió a 595 nm después de 2 minutos y antes de 1 hora de iniciada la reacción frente al blanco de reactivo preparado con 100 μ l de agua destilada y 5 ml de reactivo Bradford. La concentración de proteínas de las muestras se cuantificó interpolando sus valores correspondientes de absorbencia en la curva patrón construida.

2.3 Ensayo de adenilato ciclasa

El sistema enzimático de la AC de las membranas plasmáticas aisladas, se ensayó por el método de Bellorin-Font y Martin (51). La actividad de la AC se midió a través de la cuantificación de AMPc formado a partir de ATP, los resultados se expresan en pmoles de AMPc generados/mg de proteína/30 min. Las incubaciones se llevaron a cabo a 25°C por 30 min. en una mezcla que consistió en 50 mM Tris HCl, pH 7.6, 25 mM KCl, 1 mM IBMX, 0.2 mM EDTA, 5% suero hipoparatiroideo canino, 1 mM ATP, 25 mM fosfocreatina, 1 mg/ml de creatín fosfocinasa y 15 μ g de proteína de membrana en un volumen final de 100 μ l. Las concentraciones variables de GTP, GTP γ S, PTH, MgCl₂ y forskolina. se adicionaron según se requiriera. El ensayo se realizó a 4°C a pH 7.6. Las reacciones se iniciaron por la adición de las membranas y se terminaron colocando las muestras en un baño de agua en ebullición durante tres minutos (con lo cuál se inactiva la enzima). Las muestras se diluyeron 1:10 con amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 6.2 y el AMPc generado, se cuantificó posteriormente por radioinmunoanálisis por el método de Steiner y col. (48).

2.4 Radioinmunoanálisis (RIA) de AMPc

La cantidad de AMPc generado se cuantificó por RIA, método con gran sensibilidad y especificidad. Para que pueda aplicarse en la medición del AMPc es necesario contar con un anticuerpo altamente específico contra el mismo y un derivado marcado isotópicamente de dicha sustancia. El principio básico de este procedimiento es la competencia entre el antígeno marcado (AMPc*) y el no marcado (AMPc) por un número fijo y limitado de sitios de unión con el anticuerpo. Como resultado de esta competencia, la cantidad de AMPc* unido al anticuerpo disminuye conforme aumenta la cantidad de AMPc no radiactivo.



- AMPc : Antígeno no marcado
- AMPc* : Antígeno marcado
- Ac : Anticuerpo
- AMPc-Ac : Complejo antígeno-anticuerpo no marcado
- AMPc*-Ac : Complejo antígeno-anticuerpo marcado

Después de 20 horas de incubación, las fracciones libres y unidas del AMPc* se separan y, en este caso, la radiactividad que se cuenta es la unida al anticuerpo. El método que se empleó para separar los antígenos marcados unidos y libres fué el de precipitación con sulfato de amonio al 60% adicionado después de la inmunoglobulina G humana.

Reactivos utilizados en el RIA

Amortiguador de ensayo (diluyente): acetato de sodio 50 mM, pH 6.2

Estándares de AMPc: De una solución patrón con 10 pmol/ml de AMPc, se realizaron diluciones seriadas 1:2 para construir la curva que incluyó las siguientes concentraciones: 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 pmol/ml .

Anticuerpo: El antisuero contra AMPc fué el RB-1 que tiene una especificidad del 100% y una reactividad cruzada para el ATP del 0.005%; la dilución final del antisuero fué de 1:250,000.

Antígeno* (AMPc- ^{125}I): En cada ensayo se partía generalmente de 15,000 cpm por 200 μl .

Inmunoglobulina G humana : Se preparó una dilución 1:10 del stock de IgG humano con solución diluyente y se mantuvo en agitación al mismo tiempo que se preparaban alícuotas, las cuales se almacenaron a -35°C hasta su uso.

Solución precipitante de sulfato de amonio: Se preparaba una solución al 60% a partir de una solución sobresaturada de sulfato de amonio y se almacenaba a temperatura ambiente.

Desarrollo del método

El inmunoensayo de AMPc se llevó a cabo de acuerdo al

método de Steiner y col. (48,53), en amortiguador de acetato de sodio 50 mM a pH 6.2 (solución diluyente). Ya que el RIA se basa en una competencia, todos los tubos contenían cantidades constantes de anticuerpo y de antígeno radiactivo. Cada tubo contenía (en orden de adición): ya sea 200 μ l de solución estándar del nucleótido cíclico a cantidades progresivamente mayores, o de 50 a 200 μ l de la solución problema; 100 μ l de anticuerpo en dilución 1:25000 suficiente para unir del 35 al 55% del antígeno marcado y 200 μ l del AMPc-¹²⁵I que contenía de 8000 a 15000 cpm todo en un volumen final de 500 μ l.

Además se incluyeron los siguientes tubos:

Unos (5) que contenían 200 μ l de la solución radiactiva para obtener el total de radiactividad agregada (cuentas totales Tc). Otros (3) con 300 μ l de amortiguador y 200 μ l de radiactivo para determinar la unión inespecífica (Co). Por último, 3 que contenían 200 μ l de amortiguador, 100 μ l de anticuerpo y 200 μ l de radiactivo, para establecer el porcentaje de unión máxima (To).

Después de añadir todos los reactivos, se agitaron perfectamente cada uno de los tubos de 2 a 5 seg en un vortex, y se procedió a incubarlos en agitación constante durante 20 horas y a 4°C. Al término de la incubación, para separar la fracción unida de la libre, a cada uno se le adicionó 100 μ l de IgG y 2.5 ml de sulfato de amonio al 60 %. Se centrifugó durante 20 minutos a 2500 rpm en una centrifuga refrigerada y el sobrenadante se decantó (todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C). El AMPc presente en el precipitado se cuantificó en

un contador de radiaciones gamma durante 2 minutos cada tubo.

Medición y cálculo de resultados

Debido a que los métodos de RIA generalmente se llevan a cabo empleando curvas patrón, el cálculo de los resultados implica una adecuada interpolación de las muestras problema en dicha curva patrón. Una vez que se obtuvieron los porcentajes de unión de los estándares se trazaron las siguientes gráficas:

a) Curva semilogarítmica: se graficó la curva patrón en papel semi-log colocando en el eje de las abcisas la concentración de AMPc en pmol/tubo y, en el eje de las ordenadas el porcentaje de unión correspondiente.

b) Curva logit-log: se trazó en una gráfica el logaritmo decimal de la concentración de AMPc no radiactivo (en el eje de las abcisas) contra el logit de los cocientes U/U_0 . Con este método fué posible obtener una linearización casi total de la curva que permitió una interpolación más exacta de los datos de la que se obtendría con la curva anterior. El logit de U/U_0 es :

$$\text{logit } U/U_0 = \ln \frac{U/U_0}{100 - U/U_0}$$

La concentración de las muestras problema, en consecuencia, se consiguió al interpolar los resultados del logit U/U_0 en esta curva y realizando las correcciones necesarias correspondientes a la dilución.

2.5 Experimentos con toxina pertussis

Para obtener evidencia directa de la presencia y función de la proteína G inhibidora se utilizó, previa valoración de su actividad, la toxina elaborada por la bacteria B. pertussis para lo cual:

1) Las membranas se ADP ribosilaron con PTX en presencia de NAD-³²P por el método de Sekura y col. (49) llevado a cabo por el Dr. J. Adolfo García Sainz en el Laboratorio de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

2) Se realizó una revisión bibliográfica (26,32,39,41,54-65), con el fin de encontrar y/o adecuar un método para ADP ribosilar las membranas sin afectar su actividad y, posteriormente, realizar experimentos en los que se preincubó a las membranas con PTX, previamente activada con DTT, para después ensayar a la AC bajo diferentes estímulos (GTP, PTH, forskolina, GTP + PTH, GTP + forskolina todos ellos en presencia de MgCl₂). La realización de esta parte experimental, que representaría una clara evidencia funcional directa de la proteína G inhibidora, comprende:

a) La optimización de una técnica de ADP ribosilación con PTX, debido a que existe una gran variedad de metodologías empleadas para ADP ribosilar Gi tanto en células como en membranas. Por ejemplo, la concentración de NAD entre otros elementos, es un factor de gran importancia para conseguir la ADP ribosilación.

b) La verificación de la ADP ribosilación.

c) La obtención de un rendimiento adecuado en la ADP

ribosilación, es decir, suficiente para obtener la evidencia del bloqueo de la inhibición y al mismo tiempo, mantener funcionando al sistema enzimático.

En el presente proyecto de investigación se inició con una revisión bibliográfica; valoración *in vivo* de la actividad de la PTX; preactivación de la misma con DTT; ensayos de ADP ribosilación con las membranas; y en lo que respecta a la optimización de la técnica, ADP ribosilación probando dos concentraciones de NAD (0.01 y 1 mM), así como pruebas de recuperación y de actividad de membranas después de su manejo en la técnica de ADP ribosilación.

2.6 Valoración de la actividad de la toxina pertussis

La actividad de la toxina pertussis se valoró en ratas en las que se observaron los cambios en la frecuencia cardíaca debidos a la toxina (66). A ratas Wistar macho de 5 semanas de edad y con peso promedio de 150 g, se les midió la frecuencia cardíaca basal (pulsos/ min) diariamente por un periodo de 4 días. Se formaron un grupo control y uno experimental. El grupo experimental se trató con toxina vía intravenosa a una dosis de 50 ug por 100 g de peso corporal; por su parte, el grupo control se inyectó con el vehículo (solución salina con 1 mg/ml de albúmina sérica de bovino). A ambos grupos se les midió la frecuencia cardíaca durante los 9 días siguientes al tratamiento.

2.7 Ensayo de ADP ribosilación

Las membranas aisladas fueron ADP ribosiladas de acuerdo al método de Ribeiro-Neto y col. (54); y adaptado para mantener

funcionalmente activo al sistema de la adenilato ciclasa. La ADP ribosilación por la toxina bacteriana de Bordetella pertussis (toxina pertussis) de la proteína Gi, involucra la transferencia de ADP ribosa mediante NAD al residuo cisteína de la subunidad α de dicha proteína con lo cual se bloquea completamente su función inhibitoria (al perder la capacidad de interacción con los receptores inhibitorios).

Cabe mencionar que en preparaciones de membrana, la toxina pertussis ADP ribosila las subunidades α incubando con NAD y con el protómero A preactivado es decir, sólo cuando el puente disulfuro del protómero A ha sido reducido con ditioneitol.

2.7.1 Preactivación de la toxina pertussis

La preactivación de la toxina pertussis se llevó a cabo incubando 10 μ l de la toxina (600 μ g/ml) con 10 μ l de ditioneitol 50 mM en un tubo Eppendorf a 32 °C durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se diluyó a 120 μ g/ml de toxina con amortiguador Tris HCl 25 mM, 0.075 ASB, a pH 7.5. Una vez preactivada la toxina, se almacenó en pequeñas alícuotas a -70°C conservando su actividad hasta por dos meses.

2.7.2 ADP ribosilación

La ADP ribosilación se llevó a cabo incubando por 30 min. a 32°C una mezcla con volumen final de 60 μ l que contenía: 10 μ l (10 μ g) de membranas plasmáticas, 10 μ l de toxina pertussis preactivada (20 μ g/ml) y 7.5 μ g de ASB por ensayo, 10 μ M de NAD, 10 mM de timidina, 1 mM de EDTA, 25 mM de Tris HCl, 1 mM de ATP, 1 mM de GTP, 0.75 mM de NADP⁺. El pH final fué de 7.5. Las reacciones se iniciaron con la adición de la toxina y se

detuvieron con amortiguador de homogenización frío. Al final de este paso, se centrifugó a 12500 rpm durante 3 min. en una microcentrifuga fría. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó 2 veces en amortiguador de homogenización centrifugando cada vez a 12500 rpm durante tres minutos. El precipitado final se resuspendió en el mismo amortiguador en la cantidad necesaria para ajustar la concentración de proteínas de membrana a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Inmediatamente después de la ADP ribosilación de las membranas, se procedió a realizar el ensayo de adenilato ciclasa correspondiente.

2.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm la desviación estándar ($X \pm \text{DE}$) o el error estándar ($X \pm \text{EE}$) como se indica en las figuras. Algunos experimentos adicionalmente se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Wilcoxon. Una $p \leq 0.05$ se consideró significativa.

VI RESULTADOS

1. Aislamiento de membranas

Las membranas se aislaron a partir de 38.5 ± 13 g (promedio \pm DE) de corteza renal disecada por perro ($n = 9$) y se obtuvo un rendimiento de 15.6 ± 10.8 mg de dichas membranas. Las membranas obtenidas conservaron funcional el sistema de la adenilato ciclasa, lo que se comprobó al realizar los experimentos subsiguientes.

2. Radioinmunoanálisis de AMPc

La curva patrón se linealizó mediante la transformación a logaritmo de la dosis contra el logit de la respuesta (log-logit). En la figura # 7 se representa una curva promedio de esta transformación.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo los RIAs fueron establecidas mediante previa valoración de las mismas:

1) Temperatura de adición de los reactivos (el ensayo se realizó a temperatura ambiente), 2) orden de incorporación del antígeno (Ag) y del anticuerpo (Ac) (primero Ac y enseguida Ag), 3) tiempo y temperatura de incubación (20 h a 4°C).

Finalmente, se realizó una prueba de interferencia del ATP con el anticuerpo empleado en los RIAs donde fué comprobada la especificidad de dicho anticuerpo para AMPc (figura # 8).

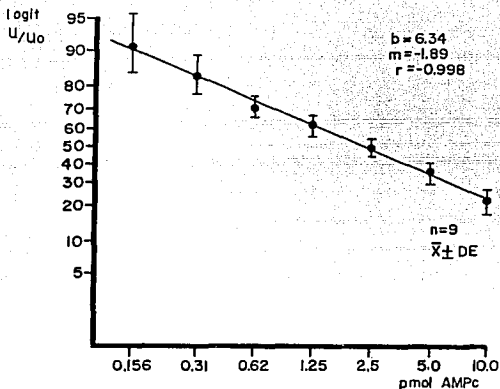


Fig. # 7 RADIOINMUNOANALISIS DE AMPc CURVA PATRON PROMEDIO.
 U/Uo= porcentaje de unión del antígeno marcado en la fracción unida.

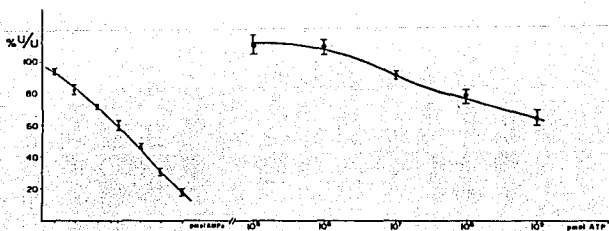


Fig. # 8. REACTIVIDAD CRUZADA DEL ATP CON EL ANTICUERPO RB-1

3. Curva de activación con $MgCl_2$

Para estudiar el efecto del magnesio en la actividad del sistema de la AC, las membranas se incubaron con diferentes concentraciones de Mg^{++} (de 0 a 160 mM). El Mg^{++} estimuló la actividad basal de la ciclasa de manera gradual conforme aumentaron las concentraciones del catión de 1.25 a 10 mM (aproximadamente 40 %); es decir, la velocidad inicial de la reacción fué proporcional a la concentración de Mg^{++} por lo que se aprecia una cinética de 1er orden (figura # 9). Posteriormente, a concentraciones cada vez mayores de Mg^{++} (de 20 a 60 mM), la velocidad de la reacción y la producción de AMPc disminuyeron gradualmente; se dice que en esta zona el orden de reacción es mixto. Después se alcanzó un punto máximo en la actividad de la ciclasa correspondiente a 60 - 80 mM de Mg^{++} (la actividad máxima fué de 1838 ± 387 pmol de AMPc) a partir del cual no se observaron cambios significativos hasta 100 mM de Mg^{++} . En este intervalo la velocidad de la reacción fué independiente de las concentraciones de Mg^{++} siguiendo ahora una cinética de orden cero en la que la enzima se encuentra saturada. Finalmente, a concentraciones muy altas de Mg^{++} (120 a 160 mM), el porcentaje de actividad de la AC disminuyó notoriamente (aproximadamente al 60 %).

Como ya se mencionó, el Mg^{++} juega un papel regulador importante en el mecanismo de estimulación de la AC, al aumentar la activación de la proteína Gs. Es decir, el Mg^{++} , facilita la unión del GTP a la proteína Gs y con esto promueve la disociación de las subunidades que se requiere para el paso de activación.

Además, aunque se sabe que la concentración de magnesio libre en la célula es aproximadamente de 0.3 a 0.4 mM, *in vitro*, a altas concentraciones de este catión, la proteína G puede activarse incluso sin la acción del complejo hormona-receptor (35). Esto se comprobó ya que en este experimento se necesitaron concentraciones de magnesio mayores a las fisiológicas para obtener actividad enzimática. Por otro lado, cuando existe estimulación hormonal disminuye el requerimiento de magnesio para activar a Gs (como se observó en la curva dosis-respuesta a PTH donde se alcanzó una máxima actividad enzimática con tan solo 5 mM de Mg^{++}) (33). La actividad de la AC con 80 mM de Mg^{++} y en ausencia de PTH fué de 1838 ± 387 pmol de AMPc, que es similar a lo que se informa en la literatura (51) y en presencia de PTH + 5 mM de Mg^{++} la actividad enzimática máxima fué de 3486 pmol de AMPc.

La curva obtenida con Mg^{++} es una curva clásica de saturación donde se observa el efecto del magnesio a través del sustrato (ATP) a concentración constante ya que, como se sabe, el magnesio es parte importante del sustrato de la enzima. Una vez alcanzada la actividad enzimática máxima, independientemente de que aumente la concentración del magnesio, dicha actividad tiende a aproximarse a una zona plana en la cual la enzima se encuentra saturada. Sin embargo, la actividad en la zona de saturación no permanece constante al aumentar más las concentraciones de Mg^{++} (de 120 a 160 mM) pues se observó una inhibición.

Por otra parte, la curva de activación con Mg^{++} también se utilizó como herramienta para probar la funcionalidad del sistema enzimático presente en las membranas recién aisladas.

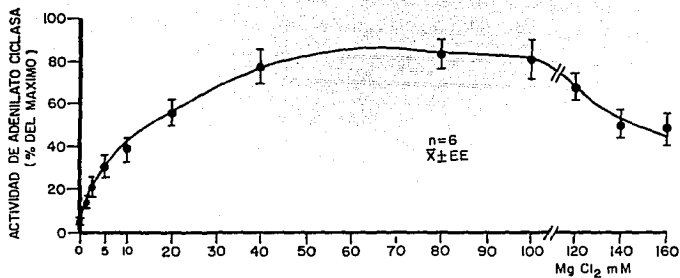


Fig. # 9 EFECTO DEL Mg⁺⁺ en la ACTIVIDAD de la AC. Los datos son el promedio de 6 ensayos separados por duplicado ± EE.

4. Linearidad en la producción de AMPc respecto a cantidades crecientes de MBCRC

En este ensayo se incubaron cantidades crecientes de membranas basolaterales aisladas de corteza renal canina (0-40 μg) con 100 mM de Mg^{++} .

Como puede observarse en la figura # 10, hubo un aumento gradual en la producción de AMPc al aumentar las cantidades de membrana presentes en el medio de incubación, es decir, la relación encontrada fué directamente proporcional. Esto nos indica que el sustrato presente en la mezcla de ensayo (1 mM de ATP) así como el sistema regenerador del mismo, no se agotan en este intervalo de cantidad de membranas y son suficientes para producir AMPc de manera lineal.

La cantidad de membranas que se utilizó para los experimentos posteriores fué de 15 μg . Se realizó este ensayo inicial para observar la linearidad en la producción de AMPc respecto a las cantidades utilizadas de membranas a una concentración de 100 mM de MgCl^{++} (es importante mencionar que en nuestro ensayo de adenilato ciclase se usaron cantidades máximas de membranas así como también una concentración estimuladora máxima de Mg^{++}).

5. Requerimiento del Mg^{++} para la estimulación de la AC por forskolina

En la figura # 11 se observa el efecto de la forskolina en ausencia de Mg^{++} sobre la AC. Es importante hacer notar, como ya se mencionó, que la preparación de membranas se obtiene con gran pureza, pero también es probable que se encuentren presentes

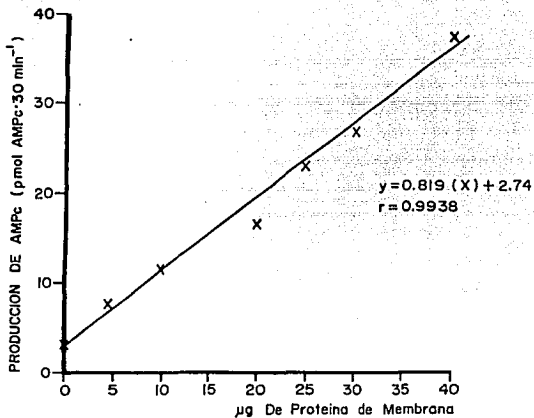


Fig. # 10. LINEARIDAD EN LA PRODUCCION DE AMPc, RESPECTO A CANTIDADES CRECIENTES DE MBCRC EN PRESENCIA DE Mg^{++} (100 mM).

ciertos elementos y entre ellos el magnesio). La mezcla de reacción, en este caso, incluyó concentraciones crecientes de forskolina de 10^{-7} a 10^{-4} M.

En este experimento se observó el requerimiento del magnesio para la estimulación de la AC por forskolina, debido a que en su ausencia, fué necesaria una alta concentración de dicho activador (10^{-4} M) para alcanzar un 100% de estimulación con respecto a la basal (52 ± 20.3 vs 105.9 ± 20.8 pmol de AMPc.mg de prot $^{-1}$.30 min $^{-1}$) ($p < 0.05$). A concentraciones menores no se aprecian cambios significativos. Este comportamiento es diferente al obtenido cuando se adiciona Mg^{++} a la mezcla de ensayo, porque concentraciones tan pequeñas de forskolina como 10^{-7} M produjeron 1484 ± 271 pmol de AMPc.mg prot $^{-1}$.30 min $^{-1}$ a diferencia de los 105.9 ± 20.8 pmol de AMPc que se generaron en ausencia de Mg^{++} . Esto sugiere que el magnesio también afecta la afinidad del sistema enzimático por forskolina y, dado que estudios previos han mostrado que los efectos alostéricos del magnesio se encuentran estrechamente relacionados a las proteínas G, cabría la posibilidad de que la forskolina también, como ya se mencionó, afectara este sitio directa o indirectamente (por ejemplo, facilitando la interacción de las proteínas G con otros componentes del sistema enzimático) (67) .

6. Requerimiento del Mg^{++} para la estimulación de la AC por GTP

Las membranas se incubaron con diferentes concentraciones de GTP de 10^{-8} a 10^{-2} M en ausencia de Mg^{++} (figura # 12).

Esta prueba muestra que la estimulación de la AC por GTP en concentraciones de 10^{-8} a 10^{-3} M no presenta diferencias significativas con respecto a la actividad basal y, por lo tanto,

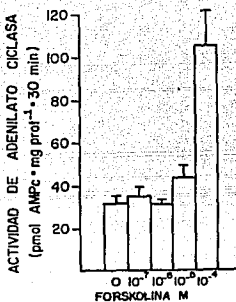


Fig. # 11. REQUERIMIENTO DE Mg^{++} PARA LA ESTIMULACION DE LA AC POR FORSKOLINA. Cada barra representa el promedio de 4 experimentos separados por duplicado \pm EE.

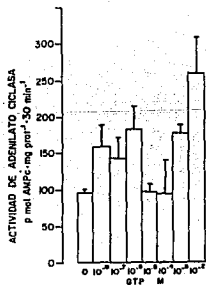


Fig. # 12. REQUERIMIENTO DE Mg^{++} PARA LA ESTIMULACION DE LA AC POR GTP. Los resultados se obtuvieron de 2 experimentos separados \pm EE.

sin la adición de Mg^{++} es necesaria una elevada concentración del nucleótido de guanina (10^{-2} M) para que con el magnesio intrínseco de las membranas pueda estimularse la producción de AMPc (de 96.3 a 260.5 pmol de AMPc) en aproximadamente un 170 %. Este comportamiento se debe a que el mecanismo de activación de Gs requiere la acción combinada de nucleótidos de guanina y magnesio pues, como ya se mencionó, este catión es imprescindible para facilitar el intercambio de GDP a GTP en la proteína Gs y, de este modo, llevar a cabo la disociación de las subunidades α de $\beta\gamma$.

7. Efecto de la forskolina sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}

En la figura # 13 se observa el efecto de la forskolina sobre la actividad de la AC de membranas basolaterales de corteza renal canina. Las membranas se incubaron con concentraciones crecientes de forskolina de 10^{-7} a 7×10^{-4} M + 5 mM de Mg^{++} , y la actividad de la AC se cuantificó mediante la producción de AMPc en $\text{pmol.mg prot}^{-1.30 \text{ min}^{-1}}$. El 50% de la actividad máxima (K de activación) se alcanzó a 10^{-5} M de forskolina de manera similar a lo informado en la literatura (67), con una producción de AMPc promedio de 1920.7 ± 523 pmol.

En este ensayo se observó que la actividad de la ciclasa se estimuló en forma dependiente de la concentración de forskolina. La relación entre las concentraciones de forskolina (10^{-7} a 7×10^{-4} M) y la actividad enzimática fué directamente proporcional. Por otra parte, se observó un aumento en la actividad de la AC estimulada con 7×10^{-4} M de forskolina respecto al basal en $\text{AMPc.mg prot}^{-1.30 \text{ min}^{-1}}$, lo que representa aproximadamente un

300% de estimulación.

En este experimento el sistema enzimático no se vió limitado en su actividad debido a las condiciones de ensayo, lo cual puede observarse en la linealidad obtenida al cuantificar la estimulación de la AC por forskolina a concentraciones de 10^{-7} a 7×10^{-4} M.

Por medio de este experimento se probó la funcionalidad del sistema a nivel de la unidad catalítica debido a que la forskolina actúa estimulando directamente dicho componente. Sin embargo, algunos aspectos de las acciones de la forskolina, tales como el desplazamiento a la izquierda de la K de activación (K_{act}) observado en este experimento a diferencia de aquel en el que no se adicionó Mg^{++} (el contenido de magnesio fué el inherente a las membranas), sugieren que este agente pudiera tener efectos adicionales sobre otros componentes del sistema de la AC como las proteínas G. Existen estudios de la interacción de la forskolina con el Mg^{++} que revelan que la forskolina aumenta, de manera dependiente de la dosis, la afinidad de la ciclasa por magnesio y que este efecto es similar al producido por otros activadores de la AC tales como el NaF y el GTP, los cuales interactúan con las proteínas G (67). Por otra parte, también se ha propuesto que la forskolina pudiera actuar sobre un sitio en la unidad catalítica de la AC que es independiente de las proteínas G, y en un sitio de alta afinidad de la misma enzima que requiere de las proteínas Gs. Ambas posibilidades podrían explicar los cambios en las K_{act} cuando la forskolina actúa sola o junto con otros activadores del sistema de la AC.

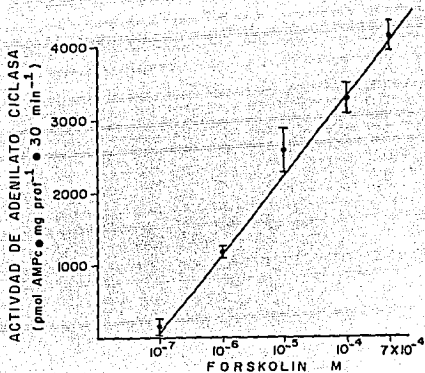


Fig. # 13. EFECTO DE LA FORSKOLINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AC EN PRESENCIA DE Mg⁺⁺ (5 mM).. A los datos se les restó la actividad basal y son el promedio de 7 ensayos separados por duplicado ± el EE.

B. Efecto del GTP sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++}

Las membranas se incubaron con diferentes concentraciones de GTP (10^{-8} a 10^{-2} M). El efecto del GTP sobre la actividad de la ciclasa mostró un comportamiento bifásico como el observado en otros estudios (64,68), debido probablemente a que promueve la producción de AMPc a concentraciones bajas (10^{-8} a 10^{-5} M) al actuar sobre la proteína G estimuladora, y su inhibición a concentraciones más altas (10^{-4} a 10^{-2} M) al actuar en la proteína G inhibidora: este efecto bifásico quizá pueda reflejar distinta afinidad por GTP de Gs y de Gi. Como puede observarse en la figura # 14, a una dosis de 10^{-5} M GTP se alcanza un aumento significativo con respecto a la actividad basal del 51 % (818 ± 217 vs 1240 ± 341 pmol, $p < 0.05$) que posteriormente decae con 10^{-3} M se obtiene un 15.6 % de inhibición con respecto a la máxima estimulación con 10^{-5} M, $p < 0.05$) hasta revertirse significativamente el efecto obteniendo, de este modo, un 73 % de inhibición con 10^{-2} de GTP ($p < 0.05$). Sin embargo, es posible que el efecto inhibitor observado en 10^{-2} M de GTP se deba, más que a una inhibición dada por Gi, al fenómeno de quelación de magnesio por el nucleótido de guanina lo que impide la activación de Gs.

Por otra parte, se pudo observar que el efecto del GTP sobre la actividad de la AC no es tan notorio como el de otros efectores tales como la forskolina o la PTHb sin 1-34, dado a que dicho efecto se produce en niveles menores de acumulación de AMPc. Lo anterior probablemente se debe a que el GTP, junto con el magnesio, activan menos eficientemente a las proteínas G que

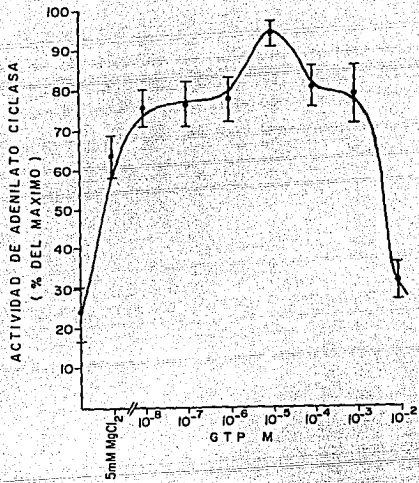


Fig. # 14. EFECTO DEL GTP SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AC EN PRESENCIA DE MAGNESIO (5 mM). Estos datos son el promedio de 7 experimentos separados por duplicado \pm el EE y se muestran menos la actividad basal.

cuando actúan todos los elementos del sistema de la AC para activar a la enzima. Por ejemplo, se sabe que los receptores juegan un papel obligatorio de ayuda en el acercamiento del GTP a la subunidad α y en la formación mediada por magnesio del complejo $G\alpha$ -GTP (35). También existen evidencias de que el papel fundamental de los receptores es el de disminuir la afinidad de G por GDP y el de aumentar el intercambio de GDP por GTP y, dado que las concentraciones intracelulares de GDP y GTP son aproximadamente de 100 μ M, la ocupación de un receptor por un agonista aumenta mucho la oportunidad de que el GTP más que el GDP, pueda interactuar con una proteína G (69). Estos datos explican el porqué se obtiene menor producción de AMPc con GTP y 5 mM de Mg^{++} , que con otros activadores de la ciclasa que involucran la acción de receptores (PTH + Mg^{++}) o de la unidad catalítica directamente (Forskolina + Mg^{++}).

9. Efecto de la PTHb sin 1-34 sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++} .

Las figuras # 15A y 15B ilustran la actividad de la AC en respuesta a concentraciones crecientes (10^{-12} a 10^{-6} M) de PTHb sin 1-34 y en presencia de 5 mM de Mg^{++} en el medio de incubación. Es evidente el efecto estimulador en la actividad de la enzima que es dependiente de la concentración de PTH ($p < 0.05$). El 50 % de la estimulación máxima se alcanzó en 10^{-8} M de PTH (2795.2 ± 554 pmol de AMPc) y a 10^{-6} M aumentó la actividad de la AC con respecto a la basal en aproximadamente 7 veces de 659.2 ± 89 a 4555.3 ± 412 pmol de AMPc (591 % de estimulación), donde se observa que la producción de AMPc tiende a mantenerse constante [comportamiento similar al reportado por Milanés y cols. (34)].

Esta fase de meseta se alcanza por saturación de los receptores para PTH disponibles en el sistema enzimático.

En este ensayo se probó la actividad del sistema de la AC aislado a nivel de receptores y pudo comprobarse que estos pasan a un estado funcionalmente activo con la acción de la PTH, lo cual se refleja en el comportamiento observado.

Por otra parte, en este caso, se utilizó una concentración de 5 mM de Mg^{++} debido a que en trabajos previos (35) se ha demostrado que el efecto estimulador de la PTH sobre la enzima aumenta cuando las concentraciones de magnesio libre en el medio de incubación se elevan de 0.1 a 6.6 mM y que a concentraciones mayores de este ión (14 mM) se presenta una inhibición de la actividad enzimática estimulada por PTH. En la curva de activación con Mg^{++} como ya se explicó, la actividad enzimática máxima se observó a concentraciones altas de Mg^{++} (80 mM), en cambio en presencia de PTH existió marcada estimulación de la ciclasa con una mínima concentración de Mg^{++} (33,35,51).

10. Efecto del GTP γ S sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++} .

Para estudiar el efecto del nucleótido de guanina GTP γ S (análogo de GTP resistente a la hidrólisis) sobre la activación de la AC, este se adicionó a las membranas a concentraciones de 10^{-9} a 10^{-3} M en presencia de 10 mM de Mg^{++} . La producción de AMPc aumentó progresivamente cuando se elevaron las concentraciones de GTP γ S (figura # 16). A una dosis de 10^{-3} M de GTP S se estimuló la actividad de la ciclasa con respecto a la basal en aproximadamente el 118 %, de 416.7 ± 31.5 a 909 ± 68.5 pmol de AMPc.

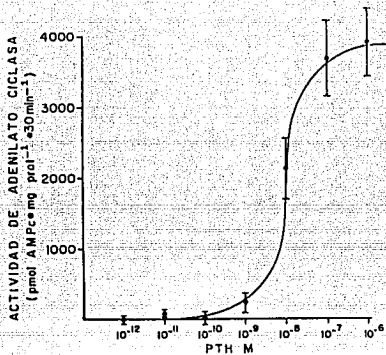


Fig. # 15 A. EFECTO DE LA PTH_b sin (1-34) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AC EN PRESENCIA DE Mg⁺⁺ (5 mM). Los datos están representados menos la actividad basal.

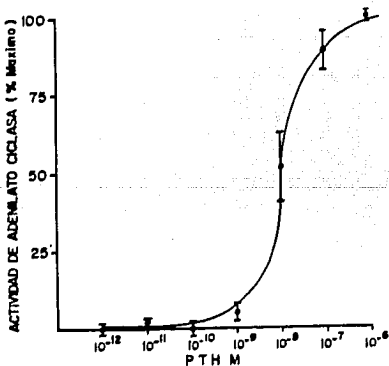


Fig. # 15 B. EFECTO DE LA PTH_b sin (1-34) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AC EN PRESENCIA DE Mg⁺⁺ (5 mM). Los datos están representados en porcentaje y menos la actividad basal.

Como puede observarse en la gráfica, a diferencia de la curva dosis-respuesta a GTP donde se aprecia un pico máximo en la actividad de la ciclase, a partir del cual desciende, con el GTP γ S 10^{-9} a 10^{-3} M no se observó tal disminución en la producción de AMPc. Probablemente este efecto esté relacionado con la resistencia a la hidrólisis del GTP γ S, ya que existen evidencias de que la inhibición solo puede observarse con GTP y no con sus análogos resistentes a la hidrólisis (10). Esto ha conducido a especulaciones en torno a que la inhibición podría involucrar una reacción de fosfotransferasa con el GTP como donador; sin embargo, no existen evidencias concluyentes para tal mecanismo.

11. Efecto del GTP en la actividad de la AC estimulada por forskolina en presencia de Mg^{++} .

Para analizar la influencia de este nucleótido de guanina sobre la activación de la AC por 100 μ M de forskolina, se agregaron concentraciones crecientes de GTP de 10^{-8} a 10^{-2} M. La figura # 17, muestra que el GTP inhibió la actividad de la AC estimulada por forskolina dependiendo de la concentración de GTP. No obstante, a una concentración de 10^{-8} M de GTP, se observa un efecto aditivo sobre la estimulación obtenida por forskolina, lo que nos indica que la ciclase no se encontraba estimulada al máximo. La diferencia entre la actividad de la AC estimulada con 100 μ M de forskolina a concentraciones de 10^{-8} y 10^{-4} M de GTP es del orden de 880 pmol de AMPc lo que representa un 21 % de inhibición ($p < 0.05$). A una concentración de 10^{-2} M la inhibición de la actividad de la enzima alcanzó el 90 % (de 4070 ± 594 a 381 ± 31.2 pmol de AMPc, $p < 0.05$) lo cual, como ya se explicó,

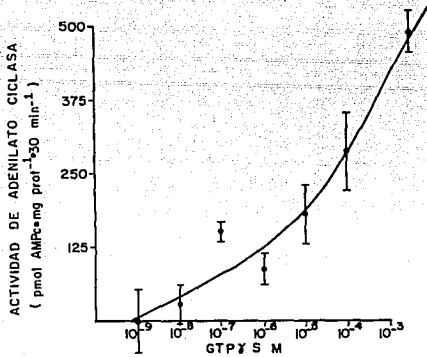


Fig. # 16. EFECTO DEL GTP μ S SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA AC EN PRESENCIA DE Mg^{++} (10 mM). Cada punto representa el promedio \pm EE de 3 determinaciones por triplicado y menos la actividad Basal.

posiblemente sea consecuencia del fenómeno de quelación de magnesio por el GTP, lo que impide la activación de Gs.

Los resultados sugieren la presencia de la proteína G inhibidora funcionalmente activa, dado que se obtuvo una disminución gradual de la actividad de la ciclasa en función de las concentraciones de GTP, hasta alcanzar una inhibición final del 20 %. En otras palabras, concentraciones altas de GTP ejercen una influencia inhibidora que parece estar originada por la activación de Gi y que contrarresta el efecto estimulatorio producido por la forskolina.

12. Efecto del GTP en la actividad de la AC estimulada por PTHb sin 1-34 en presencia de Mg^{++} .

En esta prueba la mezcla de incubación incluyó concentraciones crecientes de GTP (de 10^{-8} a 10^{-2} M), una dosis de PTH 10^{-6} M y una dosis de Mg^{++} 5 mM.

En la figura # 18, se muestra que cuando se estimuló la AC en cascada ortodoxa via receptores con PTH 10^{-6} M, aumentó la actividad de la enzima con respecto a la basal de 739.5 ± 16 a 4476.5 ± 873 pmol de AMPc, lo que representa un 505 % de estimulación. Al adicionar concentraciones de GTP de 10^{-8} a 10^{-7} M, no se producen cambios aparentes respecto a la estimulación obtenida con PTH y Mg^{++} ; a mayores dosis de GTP (10^{-6} a 10^{-4} M), se presentó un aumento de 4476.5 ± 873 a 5514 ± 1230 pmol de AMPc (es decir un 23 % de estimulación); con 10^{-3} M de GTP fué posible observar una ligera disminución en dicha producción de 5514 a 5415; y a dosis mucho mayores (10^{-2} M de GTP) hubo una franca disminución en la producción de AMPc, de 5514 ± 1230 a 684 ± 226.8 pmol de AMPc (87.6 % de inhibición en la producción).

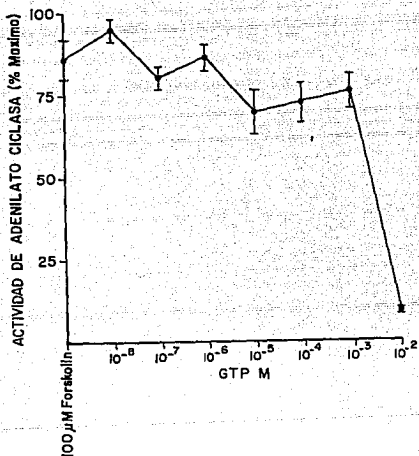


Fig. # 17. EFECTO DEL GTP EN LA ACTIVIDAD DE LA AC ESTIMULADA POR FORSKOLINA EN PRESENCIA DE Mg^{++} (5 mM). Los datos representan el promedio de 5 ensayos por duplicado \pm EE y se muestran menos la actividad basal.

Una vez más, en este experimento se observa la participación conjunta de varios elementos del sistema enzimático, como son los receptores estimuladores activados por la PTH y las proteínas Gs y Gi por el nucleótido de guanina GTP y por el Mg^{++} . Se sabe que el GTP potencia la activación de la AC renal por la PTH, comportamiento ya descrito por otros autores (70,71), y también existen evidencias de que el GTP y sus análogos influyen marcadamente en la unión de la PTH a los receptores renales (por ejemplo, Gs modula los estados de baja afinidad de los receptores por sus agonistas). Este efecto se refleja en el aumento en la producción de AMPc observado al estimular el sistema con la PTH y el GTP (de 10^{-8} a 10^{-4} M) lo cual al mismo tiempo nos indica presencia y funcionalidad de la proteína G estimuladora.

Por otra parte, a concentraciones mayores de GTP (10^{-3} M) se pudo observar una ligera disminución en la producción de AMPc, lo que nuevamente podría indicar la presencia funcional de la proteína Gi la cual, a diferencia de Gs, tiene distinta afinidad por GTP.

Es importante hacer mención que nuevamente hubo una drástica disminución en la producción de AMPc con GTP 10^{-2} M quizá debida a la quelación del magnesio por el GTP.

Finalmente, está claro que cuando la estimulación del sistema se induce al activar receptores acoplados a Gs, el efecto de concentraciones altas de GTP sobre Gi, no pudo demostrarse de manera tan clara como se observa al activar directamente Gs y Gi (GTP y GTP γ S) o a nivel de unidad catalítica (forskolina).

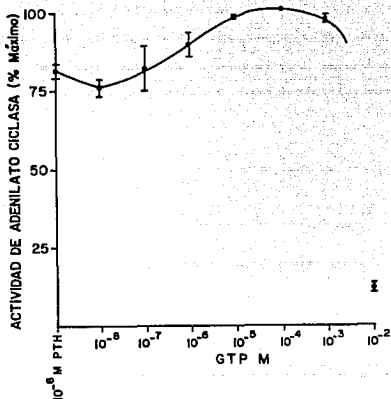


Fig. # 18. EFECTO DEL GTP EN LA ACTIVIDAD DE LA AC ESTIMULADA POR PTHb sin 1-34 EN PRESENCIA DE Hg^{++} (5 mM). Cada punto es el promedio de dos ensayos por duplicado \pm el EE y estan representados sin la actividad basal.

13. Efecto del GTP γ S en la actividad de la AC estimulada con forskolina en presencia de Mg^{++} .

Para estudiar la influencia del GTP γ S sobre la actividad de la ciclase estimulada por 100 μM de forskolina, las membranas se incubaron con concentraciones crecientes de GTP γ S (de 10^{-9} a 10^{-3} M) en presencia de 10 mM de $MgCl_2$.

La figura # 19 ilustra el efecto del GTP γ S a concentraciones crecientes sobre la actividad de la AC estimulada por forskolina. La forskolina aumentó la actividad basal de la ciclase aproximadamente 5 veces, de 272.5 ± 31.6 a 1333.3 ± 228.7 pmol de AMPc (386.6 % de estimulación). Esta actividad aumenta cuando se adiciona a la mezcla de ensayo GTP γ S de 10^{-7} a 10^{-6} M (de 1333.3 ± 228.7 a 2117.5 ± 68.7 pmol de AMPc con 10^{-6} M), lo cual nos indica que la estimulación de la ciclase por forskolina no fue la máxima. Posteriormente, se observa que la producción de AMPc disminuye al aumentar las concentraciones de GTP γ S de 10^{-5} a 10^{-3} M de 2117.5 ± 68.7 a 1420 ± 59.9 pmol de AMPc, que representa una inhibición de la actividad de la AC de aproximadamente el 33 % con respecto al punto de máxima actividad. Esta inhibición en la producción de AMPc no se debe a quelación del magnesio por el GTP γ S, ya que dicho comportamiento no se observó al ensayar la actividad de la enzima en presencia de concentraciones crecientes del nucleótido de guanina y Mg^{++} . En cambio, es probable que se encuentre participando la proteína Gi cuando las concentraciones de GTP γ S son de 10^{-5} a 10^{-3} M.

Como ya se mencionó, existen evidencias de que la inhibición de la AC solo ocurre con GTP y no con sus análogos no

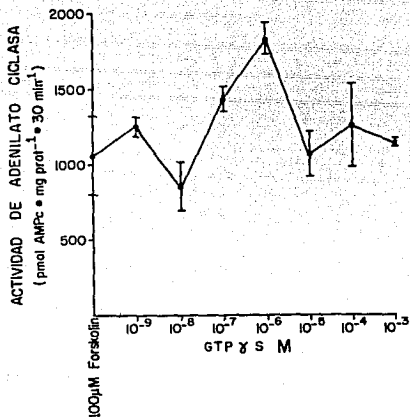


Fig. # 19 EFECTO DEL GTPγS EN LA ACTIVIDAD DE LA AC ESTIMULADA CON FORSKOLINA EN PRESENCIA DE Mg⁺⁺ (10mM). Los datos son el promedio de 2 ensayos por duplicado ± el EE y se muestran menos la actividad basal.

hidrolizables; sin embargo, también se sabe que en presencia de forskolina, el GTP γ S inhibe la actividad de la AC (10).

Por otra parte, en este ensayo se observaron los efectos que ejercen sobre la AC diversos estímulos (Mg $^{++}$, GTP γ S y forskolina) en ausencia de la activación de receptores acoplados estimuladora o inhibitoriamente.

14. Efecto del GTP γ S en la actividad de la AC estimulada con PTHb sin 1-34 en presencia de Mg $^{++}$.

A la mezcla de incubación se le agregó GTP γ S, de 10^{-9} a 10^{-3} M, 10 mM de MgCl $_2$ y PTHb sin 1-34 10^{-6} M.

La figura # 20 muestra el efecto de concentraciones crecientes de GTP γ S sobre la actividad de la AC estimulada por PTH. La PTH aumentó la actividad de la ciclasa aproximadamente 3 veces por arriba de la basal, de 260.7 ± 17 a 794.3 ± 46.1 pmol de AMPc. Es importante mencionar que esta actividad fué tres veces menor a la alcanzada en el ensayo con PTH + GTP debido probablemente al tiempo de almacenaje de las preparaciones de membrana utilizadas. La actividad de la AC estimulada por PTH además, se incrementó cuando se adicionaron altas concentraciones de GTP γ S (10^{-5} a 10^{-3} M), hasta alcanzar la máxima producción de AMPc en 10^{-3} M del nucleótido de guanina con 1139.1 ± 23.9 pmol de AMPc (43 % de estimulación con respecto a la actividad en presencia de PTH y Mg $^{++}$). Este comportamiento es similar al observado cuando se ensayó el efecto del GTP sobre la actividad de la AC estimulada por PTH (con excepción de la fase de meseta encontrada en dicho ensayo), y al obtenido en la curva dosis respuesta a GTP γ S + Mg $^{++}$. Este último efecto refleja nuevamente una mayor eficacia en el funcionamiento del sistema enzimático

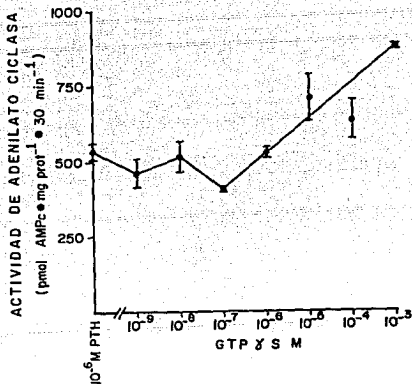


Fig. # 20. EFECTO DEL GTP γ S EN LA ACTIVIDAD DE LA AC ESTIMULADA CON PTHb sin (1-34) EN PRESENCIA DE Mg⁺⁺ (10 mM). Cada dato representa el promedio de 3 ensayos por duplicado \pm EE y se muestran sin la actividad basal.

cuando actúan en conjunto varios elementos, como los receptores estimuladores (activados por PTH) y las proteínas G (activadas por GTP γ S y Mg^{++}).

En este caso, no se observa alguna fase inhibitoria en la curva obtenida probablemente debido a que no se alcanzó la máxima actividad enzimática necesaria para conseguir dicha inhibición (como en el caso de la curva con GTP γ S + 100 μ M de forskolina) o bien, porque el GTP γ S solo presenta efectos estimuladores al actuar sobre G_s .

15. Valoración de la Actividad de la Toxina Pertussis

La actividad de la PTX se valoró por medio de un ensayo biológico in vivo en ratas control y ratas tratadas con la PTX a una dosis de 50 μ g/100 g de peso corporal. En la figura # 21 se observa que la PTX produjo un aumento en la frecuencia cardiaca de las ratas a partir de las 24 h posteriores a su aplicación, de 197.9 ± 14 a 563.3 ± 33 puls/min. El efecto de la PTX se mantuvo a lo largo de los 9 días en que se siguió su respuesta (la frecuencia cardiaca basal se midió los días -2 a 0).

16. ADP ribosilación con NAD- ^{32}P de la subunidad alfa mediante el uso de la toxina pertussis (PTX)

Las membranas se incubaron con NAD- ^{32}P en presencia de PTX activada según el método descrito por Sekura y col (49). Esto se realizó en el Laboratorio de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el Dr Jesús Adolfo García Sáinz.

En la figura # 22 se observa el análisis autorradiográfico del producto radiactivo que resultó de la ADP ribosilación catalizada por la PTX, mediante electroforesis en gel de

VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA
PERTUSSIS EN RATAS

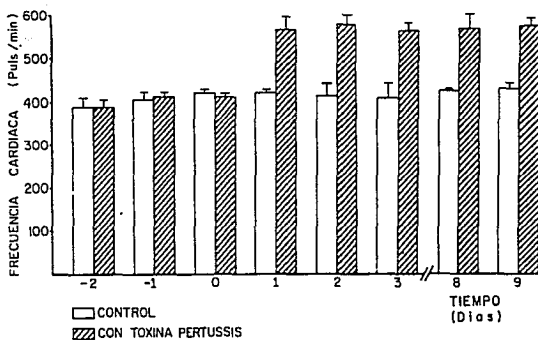


Fig. # 21. VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TOXINA PERTUSSIS EN RATAS. Los resultados representan el promedio \pm la DE.

poliacrilamida. La banda obtenida corresponde a una proteína de 41,000 daltons que representa una clara evidencia de la subunidad alfa de la proteína Gi en la preparación de membranas basolaterales aisladas de corteza renal canina.

Cabe mencionar, que la banda obtenida de este análisis aunque se encuentra bien definida, presenta un grosor reducido debido a que no se incorporó una gran cantidad de ^{32}P . Por este motivo, se puede inferir que la cantidad presente de Gi en este tipo de membranas es escasa.

17. Experimentos de ADP ribosilación con PTX

Se realizaron experimentos de ADP ribosilación con PTX por el método de Ribeiro-Neto (54,72) modificado para mantener activo al sistema enzimático presente en las membranas. Los experimentos consistieron en estimular la producción de AMPc con PTH o forskolina para después inhibirla con concentraciones crecientes de GTP y, mediante la ADP ribosilación de la subunidad α , con PTX, bloquear tal inhibición y, de este modo, evidenciar funcionalmente a la proteína Gi. Se escogió el método de Ribeiro-Neto debido a que es de los más actuales y donde se analizan con mayor precisión las condiciones de ADP ribosilación con PTX. Sin embargo, el método implicó el manejo excesivo de las membranas, las cuales disminuyeron en cantidad después de los pasos de lavado de la mezcla de ADP ribosilación, siendo la recuperación de proteínas de membrana de aproximadamente el 50 %. También se observó que las membranas recuperadas después del tratamiento de ADP ribosilación, presentaban una pérdida importante de actividad enzimática. Estas dos consecuencias del manejo de las membranas, a su vez, impidieron observar de manera



Fig. # 22 AUTORRADIOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE LA ADP RIBOSILACION DE LA SUBUNIDAD α DE G_i CATALIZADA POR PTX.

clara el efecto de activadores del sistema como son el GTP, forskolina y PTH, que se observó en membranas no alteradas por dicho manejo. Lo anterior se refleja en las curvas elaboradas a partir de experimentos de ADP ribosilación, con bajas producciones de AMPc en un principio, y posteriormente en un "aplanamiento" en dicha producción. Esto también impidió observar los efectos de un probable bloqueo en la actividad de Gidado por PTX, ya que no se obtuvieron diferencias significativas entre los experimentos controles (con mezcla de ADP ribosilación sin PTX) y los tratados con PTX.

Al realizar experimentos de ADP ribosilación de manera comparativa entre membranas aisladas de diferentes perros (4 en total), se observó el comportamiento descrito pero a distintos niveles producción de AMPc. Sin embargo, es importante notar que las membranas provenientes (aisladas) de uno de los perros, presentaron una alta producción de AMPc y, a pesar de la pérdida de actividad enzimática ya discutida, en estas membranas sí pudo observarse claramente tanto el efecto de la forskolina estimulando al sistema, y el del GTP inhibiéndolo, así como un aparente bloqueo de esta inhibición por PTX. Esto sugiere que mientras más alto es el nivel de activación de la AC (más integridad del sistema y mayor producción de AMPc) mejor se observan los efectos de los diversos activadores del sistema.

Por otra parte, al probar dos concentraciones extremas de NAD (0.01 y 1 mM) en los ensayos de ADP ribosilación, se observó una completa inhibición en la actividad de la AC debido quizá a que la cantidad liberada de adenina fué demasiado alta (1 mM), o fué insuficiente para llevarse a cabo la ADP ribosilación.

VII DISCUSION

En este trabajo se estudió el sistema de la AC sensible a hormona paratiroidea de membranas basolaterales de corteza renal canina, y particularmente la presencia y funcionalidad de la proteina G inhibidora, para comprender algunos de los mecanismos involucrados en la regulación del sistema enzimático bajo diferentes condiciones.

Los experimentos realizados, por una parte, sugieren que el sistema enzimático de membranas basolaterales aisladas de corteza renal canina, se encuentra funcional y puede activarse a diferentes niveles como son: receptores (estimulados con PTH), proteínas G (estimuladas con $MgCl_2$, GTP y GTP γ S) y unidad catalítica (estimulada con forskolina); por otra parte, apoyan la probable existencia de una regulación tanto por Gs como por Gi de la actividad del sistema enzimático estimulado por PTH (73).

Al probar la actividad del sistema enzimático cuando se aumentó progresivamente la cantidad de membranas en la mezcla habitual de ensayo, manteniendo constante la concentración del sustrato ATP, se observó una respuesta en el AMPc directamente proporcional a la cantidad de membranas. De este modo, este experimento demostró que en el intervalo de cantidades de membranas probadas, el ATP y su sistema regenerador son suficientes para producir AMPc de manera lineal. La cantidad de membrana empleada en los experimentos posteriores se encontró dentro de dicho intervalo.

El papel importante del Mg^{++} en la regulación de la actividad de las proteínas G que estimulan o inhiben a la AC pudo confirmarse mediante diferentes experimentos:

La curva de activación con Mg^{++} que presentó un comportamiento típico de saturación enzimática, además de ser una herramienta de prueba de la funcionalidad de dicho sistema obtenido por aislamiento de membranas, fué de gran utilidad para confirmar el importante papel regulador que juega este catión en el mecanismo de estimulación de la AC, mediante la activación de Gs. Como se sabe, el ciclo de activación de la AC requiere de la disociación de las subunidades de las proteínas Gs, que se logra cuando el Mg^{++} facilita la unión del GTP a la subunidad α s. De este modo, en este experimento fué posible comprobar que, in vitro, altas concentraciones de Mg^{++} son capaces de activar a las proteínas Gs sin la interacción de la hormona con el receptor (35), ya que fué necesaria una concentración de 80 mM de $MgCl_2$ para alcanzar la actividad enzimática máxima. Por otra parte, el requerimiento de Mg^{++} para la activación del sistema enzimático disminuye cuando se presenta una estimulación hormonal (33), esto pudo observarse en el ensayo con diferentes concentraciones de PTH y magnesio.

En los experimentos con diferentes concentraciones de GTP y aquellos con distintas concentraciones de forskolina en presencia y ausencia de Mg^{++} cada uno, nuevamente se comprobó que el Mg^{++} resulta fundamental como elemento regulador en el proceso de activación de las proteínas G. En la curva dosis-respuesta a GTP + 5 mM de Mg^{++} , se observó una respuesta bifásica que

probablemente muestra la diferente afinidad de Gs y de Gi por GTP (68); sin embargo, en la curva dosis-respuesta al mismo nucleótido de guanina pero en ausencia de Mg^{++} , los niveles de producción de AMPc obtenidos fueron menores y además, a concentraciones bajas de GTP (10^{-8} a 10^{-3} M), no se observaron diferencias significativas con respecto a la actividad basal, sino que fué indispensable una concentración muy alta de GTP (10^{-2} M) para que con el magnesio intrínseco de las membranas purificadas, se pudiera estimular la producción de AMPc. Las diferencias observadas entre estos dos experimentos se debieron a que el Mg^{++} es esencial para que, junto con el GTP, active a la proteína Gs.

En la curva dosis respuesta a forskolina y 5 mM de Mg^{++} se observó una activación en la que la producción de AMPc aumentó progresivamente con las concentraciones de forskolina. Además de probar la funcionalidad del sistema a nivel catalítico, también fué posible comprobar que el magnesio se requiere para este tipo de estimulación, debido a que en su ausencia fué necesaria una concentración de 10^{-4} M de forskolina para obtener actividad enzimática. Esto sugiere, como ya se mencionó, que el catión aumenta la afinidad por la forskolina y, debido a que también fué evidente un desplazamiento a la izquierda en la K act. en presencia de Mg^{++} , se ha propuesto (67) que la forskolina actúa o bien sobre otro sitio además de la unidad catalítica, como pudieran ser las proteínas Gs, o sobre dos sitios diferentes de la unidad catalítica (posiblemente uno de alta afinidad que requiere de las proteínas Gs y otro de baja afinidad).

Se estudió el efecto del análogo no hidrolizable de GTP, el GTP γ S, sobre la actividad de la AC, y se observó que en ausencia de forskolina, el GTP γ S (10^{-9} a 10^{-3} M) + Mg^{++} (10 mM) así como el GTP γ S (10^{-9} a 10^{-3} M) + PTH (10^{-6} M) y 10 mM de Mg^{++} , solo ejercen estimulación sobre el sistema enzimático. Este comportamiento en el que no se observa alguna fase inhibitoria, se ha descrito en otros estudios (68) que han conducido a especulaciones acerca de un mecanismo de reacción de fosfotransferasa o de aumento en la actividad de la GTPasa en donde interviene el GTP como donador del grupo fosfato.

La presencia física de la proteína G inhibitoria en el sistema enzimático en estudio, se comprobó mediante la ADP ribosilación llevada a cabo por la toxina pertussis, que utilizó como sustrato NAD- ^{32}P . De la electroforesis en gel de poliacrilamida, se obtuvo una autorradiografía que muestra una banda definida con un peso aproximado de 42 Kdaltones y que corresponde a la subunidad α' de la proteína G inhibitoria. Como se sabe, la toxina pertussis ADP ribosila entre otras, a la subunidad α de la proteína G_i por lo que es una herramienta de gran utilidad para lograr su identificación.

Varios experimentos sugieren la presencia funcional de la proteína G_i así como su influencia en la regulación de la actividad del sistema de la AC:

- 1) En la curva que muestra el efecto del GTP sobre la actividad de la AC en presencia de Mg^{++} , se observó una respuesta bifásica (64,68) dado que bajas concentraciones (10^{-8} a 10^{-4} M) de este nucleótido estimularon la producción de AMPc y

concentraciones mayores (10^{-3} a 10^{-2} M) la inhibieron. Como se sabe, el GTP se encuentra involucrado en la activación de las proteínas G al inducir la disociación de la subunidad α de las subunidades $\beta\gamma$; en consecuencia, la respuesta bifásica que se observa en este experimento, probablemente se deba a que bajas concentraciones de GTP activan a la proteína Gs y altas concentraciones activan a la proteína Gi y, por lo tanto, esto indicaría que ambas proteínas G probablemente poseen distinta afinidad por dicho nucleótido de guanina (64,68).

2) La curva de activación con PTHb sin 1-34 en presencia de Mg^{++} , por una parte comprobó la funcionalidad de los receptores a esta hormona presentes en las membranas aisladas, y se observó su saturación al aumentar progresivamente la cantidad de PTH que se adicionó a la mezcla de ensayo. Por otra parte, en este experimento solo se observó un efecto neto estimulatorio; sin embargo, al estimular el sistema enzimático con diferentes concentraciones de GTP + 10^{-6} M de PTH y 5 mM de Mg^{++} , fué posible apreciar un comportamiento muy parecido al que se obtuvo en la curva con GTP y magnesio, donde la respuesta bifásica sugiere la actividad tanto de Gs como de Gi, a diferencia de que la respuesta se encuentra en niveles mayores de producción de AMPc. Por lo tanto, en este caso, fué posible observar la restricción en la actividad de la AC estimulada por PTH cuando altas concentraciones de GTP actúan sobre Gi. De este modo, se contrarresta el efecto de la PTH sobre la proteína Gs y se evidencia la regulación dual en la actividad enzimática.

3) El efecto del GTP sobre la actividad de la AC estimulada con forskolina y magnesio, mostró una regulación dual que involucra tanto a Gs como a Gi. Una concentración mínima de GTP (10^{-8} M) provocó un aumento en la actividad de la unidad catalítica de la AC previamente estimulada de manera directa por la forskolina, lo cual refleja la acción aditiva de la proteína Gs. Concentraciones progresivamente mayores del nucleótido de guanina causaron una inhibición en la producción de AMPc que llegó a ser del 21 % con 10^{-3} M de GTP y que probablemente representó una acción inhibitoria de la proteína Gi. En este experimento, el efecto inhibitorio dado por la proteína Gi, es más evidente que el observado con diferentes concentraciones de GTP + 5 mM de Mg^{++} + 10^{-6} M de PTH, debido probablemente a que la misma hormona actúa preferentemente sobre Gs.

4) En el experimento con GTP γ S a diferentes concentraciones (de 10^{-9} a 10^{-3} M) + 5 mM de Mg^{++} + 100 μ M de forskolina, se observó primero un aumento en la actividad basal de la ciclase cuando estuvo presente la forskolina (386.6 % de estimulación), posteriormente con GTP γ S 10^{-7} y 10^{-6} M, se presentó un incremento adicional que indica que la AC no se estimuló al máximo. A concentraciones mayores de GTP γ S (de 10^{-5} a 10^{-3} M) disminuyó progresivamente la producción de AMPc hasta alcanzar una inhibición del 33 % respecto al punto de máxima actividad, que probablemente refleje la participación de Gi.

La magnitud de la inhibición alcanzada en los diferentes experimentos mencionados (del 20 al 30 % de inhibición aproximadamente), podrían sugerir que la proporción de Gi con

respecto a Gs sea menor. Sin embargo, también se sabe que a pesar de contar con condiciones óptimas, no ocurre una completa inhibición de la AC (la máxima inhibición generalmente se encuentra alrededor del 50%) y, además, es independiente del ligando inhibitorio utilizado e independiente de si se estudia la actividad basal o estimulada por hormonas. Hasta el momento no existe una explicación para la naturaleza parcial del efecto inhibitorio (10).

Por otro lado, como ya se mencionó, la presencia física de la proteína G inhibidora fué comprobada mediante la ADP ribosilación con PTX en presencia de NAD-³²P y también, algunos de los experimentos realizados sugieren, de manera indirecta, la presencia funcional de dicha proteína. Para obtener una evidencia funcional directa, se utilizó a la toxina pertussis y se realizaron con las membranas experimentos de ADP ribosilación por el método de Ribeiro-Neto modificado para mantener activo al sistema. La técnica de ADP ribosilación (probablemente los pasos relacionados con el lavado de membranas) afectó de manera importante la cantidad y la integridad de las proteínas de membrana cuya actividad disminuyó y, en consecuencia, no fué posible apreciar claramente la acción de activadores del sistema enzimático, lo que se reflejó en las curvas como una zona de "aplanamiento" en la producción de AMPc. Lo anterior sugiere que mientras más bajo es el nivel de producción de AMPc alcanzado, más difícil es observar el efecto de dichos activadores.

Probablemente, la misma disminución en la actividad de las membranas impidió observar el efecto de la PTX sobre el sistema

enzimático.

Por otra parte, al realizar la revisión bibliográfica de las técnicas de ADP ribosilación, fué evidente la existencia de una amplia variedad de estas para ADP ribosilar Gi, tanto en células como en membranas, y que las condiciones para ADP ribosilar Gs con CTX se encuentran bien estandarizadas (con pocas variaciones). Sería conveniente continuar con la optimización de las condiciones de ADP ribosilación con PTX. Además, en la literatura, la mayoría de los ensayos de ADP ribosilación se encuentran encaminados a lograr la incorporación de ^{32}P a la subunidad α , y así obtener una banda marcada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y autorradiografía, que indique la presencia física de Gi como la obtenida en nuestro ensayo. Sin embargo, tomando en cuenta las condiciones particulares de nuestra preparación de membranas, obtenidas con un alto grado de pureza así como la necesidad de conservarlas fisiológicamente activas, hacen más difícil la ADP ribosilación, porque, como ya se mencionó, el método condujo al manejo excesivo de las membranas que hizo disminuir su capacidad de respuesta.

En lo que respecta al inicio de experimentos de optimización de la técnica de ADP ribosilación, las dos concentraciones probadas de sustrato no fueron las adecuadas ya que probablemente $10 \mu\text{M}$ de NAD no fué suficiente para conseguir la ADP ribosilación, aunque sí se observó actividad enzimática; o bien, estuvo en exceso (1 mM) por lo que la cantidad liberada de adenina, la cual es inhibidora, fué demasiado alta.

Cabe la posibilidad de que la ADP ribosilación no pudiera haberse observado debido a que es probable, a juzgar por la baja magnitud de la inhibición obtenida en los ensayos previos a los de ADP ribosilación, que la proporción de Gi con respecto a Gs sea menor, por lo que al dañar a Gi con el manejo de las membranas, su función ya no resultara ser del todo evidente.

VIII CONCLUSIONES

- 1) Los datos obtenidos comprueban que contamos con técnicas necesarias para el estudio in vitro del sistema enzimático de la adenilato ciclasa de membranas basolaterales aisladas de corteza renal canina.
- 2) El sistema se mantuvo funcional y pudo ser activado a diferentes niveles (receptores, proteínas G y unidad catalítica).
- 3) Se logró la identificación de la proteína Gi en el sistema enzimático de la adenilato ciclasa.

IX BIBLIOGRAFIA

- 1) Garcia-Sainz JA. Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. México. Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V. 1-108 pp, 1987.
- 2) Berridge MJ. The molecular basis of communications within the cell. Sci Am 253:142-152, 1985.
- 3) Schramm M, Selinger Z. Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system. Science 225:1350-1356, 1984.
- 4) Darnell J, Lodish H, Baltimore D. Molecular cell biology. New York, USA. Scientific American Books. Cap. 16:667-713, 1986.
- 5) Pedraza-Chaverri J, Garcia-Sainz JA. Comunicación intercelular y transducción. pp. 35-52, 1993. En: Tratado de Nefrología, Ed por JL Rodicio, M Martínez-Maldonado y J. Herrera-Acosta, Ediciones Norma. Madrid, España.
- 6) Bourne H. One molecular machine can transduce diverse signals. Nature 321:814-816, 1986.
- 7) Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ. A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Am Chem Society 26:2657-2664, 1987.
- 8) Jeffries WB, Pettinger WA. Adrenergic signal transduction in the kidney. Miner Electrolyte Metab 15:5-15, 1989.
- 9) Ross EM, Gilman AG. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. Ann Rev Biochem 49:533-564, 1980.
- 10) Spiegel AM, Downs RW Jr. Guanine nucleotides: key regulators of hormone receptor-adenylate cyclase interaction. Endocr Rev 2:275-305, 1981.

- 11) Casperson GF, Bourne HR. Biochemical and molecular genetic analysis of hormone-sensitive adenylyl cyclase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 27:371-384, 1989.
- 12) Spiegel AM, Gierschik P, Levine MA, Downs RW Jr. Clinical Implications of guanine nucleotide-binding proteins as receptor-effector couplers. *N Engl J Med* 312:26-33, 1985.
- 13) Dohlman E. Adrenergic receptor structure and function. *Kidney Int* 32:S8-S13, 1987.
- 14) Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature* 333:129-134, 1988.
- 15) Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ. Structure and function of the β -adrenergic receptor homology with rhodopsin. *Kidney Int* 32:S2-S7, 1987.
- 16) O'Dowd BF, Lefkowitz RJ, Caron MG. Structure of the adrenergic and related receptors. *Ann Rev Neurosci* 12:67-83, 1989.
- 17) Rabkin R, Mahoney CA. Hormones and the kidney in diseases of the kidney. Vol. 7 Schrier, R. W. and Gottschilk, C. W. Little Books and Co. Boston, 309-332 pp, 1988.
- 18) Gilman GA. G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell* 36:577-579, 1984.
- 19) Lefkowitz JR, Caron MG. Adrenergic receptors. Models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J Biol Chem* 263:4993-4996, 1988.
- 20) Holbrook SR, Kim SH. Molecular model of the G protein subunit based on the crystal structure of the H RAS protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1751-1755, 1989.

- 21) Birnbaumer L, Abramowitz J, Yatani A, Okabe K, Mattera R, Graf R, Sanford J, Codina J, Brown A. Roles of G proteins in coupling of receptors to ionic channels and the other effector systems. *Biochem Molec Biol* 25:225-244, 1990.
- 22) Iyengar R, Birnbaumer L. Signal transduction by G-proteins. *ISI Atlas of Science: Pharmacology* 213-221, 1989.
- 23) Casey P, Gilman AG. G protein involvement in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 263:2577-2580, 1988.
- 24) Gilman AG. Regulation of adenylyl cyclase by G proteins. *The Biology and Medicine of Signal Transduction* 51-57, 1990.
- 25) Birnbaumer L, Codina J, Mattera R, Yatani A, Scherer N, Toro MJ, Brown AM. Signal transduction by G protein. *Kidney Int* 32:S-14 - S-37, 1987.
- 26) Ui M, Katada T, Murayama T, Kurose H, Yajima M, Tamura M, Nakamura T, Nogimori K. Islet activating protein, pertussis toxin: A specific uncoupler of receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *Adv Cycl Nucleot Protein Phosphory Res* 17:145-151, 1984.
- 27) Garcia-Sainz JA. Effect of pertussis toxin on the hormonal responsiveness of different tissues. *Biochem J* 228:277-280, 1985.
- 28) Levitzki A. Regulation of adenylate cyclase by hormones and G proteins. *FEBS Lett* 211:113-118, 1986.
- 29) Ross EM, Howlef AC, Ferguson KM, Gilman A. Reconstitution of hormone-sensitive adenylate cyclase activity with resolved components of the enzyme. *J Biol Chem* 253:6401-6412, 1987.

- 30) Birnbaumer L, Codina J, Mattera R, Yatani A, Scherer NM, Toro MJ. Signal transduction by G proteins. *Kidney Int* 32:S14-S37, 1987.
- 31) Smigel M, Katada T, Northup JK, Bokoch GM, Ui M, Gilman AG. Mechanisms of guanine nucleotide-mediated regulation of adenylate cyclase activity. *Adv Cycl Nucleot Protein Phosphory Res* 17:1-18, 1984.
- 32) Katada T, Ui M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:3129-3133, 1982.
- 33) Iyengar R, Birnbaumer L. Hormone receptor modulates the regulatory component of adenylyl cyclase by reducing its requirement for Mg^{++} and enhancing its extent of activation by guanine nucleotides. *Proc Natl Acad Sci* 79:5179-5183, 1982
- 34) Milanes CL, Pernalet N, Starosta R, Pérez-González M, Paz-Martínez V, Bellorin-Font E. Altered response of adenylate cyclase to parathyroid hormone during compensatory renal growth. *Kidney Int* 36:802-809, 1989.
- 35) Bellorin-Font E, Milanes CL, Starosta R, López C, Weisinger JR, Paz-Martínez V. Effects of magnesium on the regulation of parathyroid hormone-dependent adenylate cyclase. *Kidney Int* 34:S20-S25, 1989.
- 36) Stryer L. *Biochemistry*. 3a ed. New York. USA. W. H. Freeman and Company. Cap 38. 975-1004 pp, 1988.
- 37) Mahoney CA, Nissenson R A. Canine renal receptors for parathyroid hormone. Down-regulation in vivo by exogenous

parathyroid hormone. Clin Invest 72:411-421, 1983.

38) Boyer JL, Garcia A, Posadas C, Garcia-Sainz JA. Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonist of renal and adrenoceptors. J Biol Chem 259:8076-8079, 1984.

39) Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, Gilman AG. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. J Biol Chem 258:2072-2075, 1983.

40) Ui M. Islet activating protein, pertussis toxin: a probe for adenylate cyclase. TIPS 7:277-279, 1984.

41) Ueda K, Hayaishi O. ADP-Ribosylation. Ann Rev Biochem 54:73-100, 1985.

42) Coburn JW, Slatopolsky E. Vitamin D, parathyroid hormone, and renal osteodistrophy in the kidney. Brenner y Rector. Editado por W B Saunders Company. Tercera edición. México. 1657-1729 pp, 1986.

43) Kaplan L, Pesce AJ. Química clínica. Técnicas de Laboratorio-Fisiopatología-Métodos de Análisis y Correlación. Cap. 42 Glándulas Paratiroides. Kozera, R J. México. Ed. Panamericana. 955-965, 1986.

44) Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT Jr. Parathyroid hormone: Biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. Physiol Rev 64:985-1053, 1984.

45) Fitzpatrick LA, Brand ML, Aurbach GD. Control of PTH secretion is mediated through calcium channels and is blocked by pertussis toxin treatment of parathyroid cells. Biochem Biophys Res Commun 138:960-965, 1986.

- 46) Nissenson RA, Diap D, Strewler GJ. Synthetic peptides comprising the amino-terminal sequence of a parathyroid hormone like protein from human pregnancies. Binding to parathyroid hormone receptors and activation of adenylate cyclase in bone cells and kidney. *J Biol Chem* 263:12566 - 12871, 1988.
- 47) Vander AJ. *Fisiologia Renal*. McGraw Hill; 3a ed; México; 1988: 192 - 202 pp.
- 48) Steiner AL, Kipnis DM, Utiger J, Parker CW. Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3'5' cyclic phosphate. *Proc Nat Acad Sci USA* 64:367-373, 1969.
- 49) Sekura RD, Fish F, Manclarck CR, Meade B, Zhang YL. *J Biol Chem* 258:14651-14677, 1983.
- 50) Ebel H, Aulbert E, Merker HJ. Isolation of the basal and lateral plasma membranes of rat kidney tubule rats. *Bioche Biophys Acta* 433:531-546, 1976.
- 51) Bellorin-Font E, Martin KJ. Regulation of the PTH-receptor-cyclase system of canine kidney: effects of calcium, magnesium, and guanine nucleotides. *Am J Physiol* 241:F364-F373, 1981.
- 52) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem* 72:248-254, 1976.
- 53) Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247:1106-1113, 1972.
- 54) Ribeiro-Neto F, Mattera R, Grenet D, Sekura RD, Birnbaumer L, Field JB. Adenosine diphosphate ribosylation of G proteins by pertussis and cholera toxin in isolated membranes.

Different requirements for an effects of guanine nucleótides and Mg. Mol Endocrinol 1:472-481, 1987.

55) Katada T, Ui M. Islet - activating protein. J Biol Chem 256:8310-8317, 1981.

56) Tamura M, Nogimori K, Murai S, Yajima M, Ito K, Katada T, Ui M, Ishii S. Subunit structure of islet - activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. Biochemistry 21:5516-5522, 1982.

57) Katada T, Ui M. ADP-ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. J Biol Chem 257:7210-7216, 1982.

58) Cote TE, Frey EA, Sekura RD. Altered activity of the inhibitory guanyl nucleotide-binding component (Ni) induced by pertussis toxin. J Biol Chem 259:8693-8698, 1984.

59) Malaisse WJ, Svoboda M, Dufrane SP, Malaisse-Lagae F, Christophe J. Effect of Bordetella pertussis toxin on ADP-ribosylation of membrane proteins, adenylate cyclase activity and insulin release in rat pancreatic islet. Am J Physiol 124:190-196, 1984.

60) Watkins PA, Burns DL, Kanaho Y, Teh-Yung L, Hewlett LE, Moss J. ADP ribosylation of transducin by pertussis toxin. J Biol Chem 260:13478-13482, 1985.

61) Okajima F, Katada T, Ui M. Coupling of the guanine nucleotide regulatory protein to chemotactic peptide receptors in neutrophil membranes and its uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin. J Biol Chem 260:6761-6768, 1985.

- 62) Kawai Y, Whitsel L, Arinze IJ. NADP⁺ enhances cholera and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of membrane proteins. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphoryl Res* 11:265-274, 1989.
- 63) Eide B, Gierschik P, Spiegel A. Immunochemical detection of guanine nucleotide binding proteins mono-ADP-ribosylated by bacterial toxins. *Biochemistry* 25:6711-6715, 1986.
- 64) Arima T, Segawa T, Nomura Y. Influence of pertussis toxin on the effects of guanine nucleotide on adenylate cyclase in rat striatal membranes. *Life Sci* 39:2429-2434, 1986.
- 65) Tanuma S, Kawashima K, Endo H. Eukariotic mono(ADP-ribosyl)transferase that ADP-ribosylates GTP-binding regulatory Gi protein. *J Biol Chem* 263:5485-5489, 1988.
- 66) Boyer MJL, Cardenas C, Posadas C, Garcia-Sainz JA. Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure by alpha₂-adrenergic agonists. *Life Sci* 26: 2627-2633, 1983.
- 67) Martin KJ, Stokes TJ Jr, McConkey ChL Jr. Influence of forskolin on the parathyroid hormone dependent adenylate cyclase system of canine kidney: Evidence for non catalytic effects of forskolin. *Endocrinology* 115:1678-1682, 1984.
- 68) Biondi C, Borasio PG, Ferretti ME, Pareschi MC. Supra-additive activation of guinea-pig superior cervical ganglion adenylate cyclase by PGE₂ and D-Ala²-Met-enkephalinamide: role of GTP. *Neurochem Res* 15:785-789, 1990.
- 69) Gosse ME, Frey EA, Cote JE. Sites of pertussis toxin-

induced ADP-Ribosylation on Gi is critical for receptor modulation of GDP Interaction with Gi. Mol Endocrinol 3:315-324, 1989.

70) Teitelbaum AP, Nissenson RA, Zitzner LA, Simon K. Dual regulation of PTH-stimulated adenylate cyclase activity by GTP. Am J Physiol 251:F858-F864, 1986.

71) Bellorin-Font E, Milanés CL, Starosta R, Pernaleté N, Weisinger R, Paz-Martínez V. Effect metabolic acidosis on the parathyroid hormone dependent adenylate cyclase of canine kidney during dietary phosphorus deprivation: role of G proteins. Am J Physiol 258:F1640-F1649, 1990.

72) Ribeiro-Neto F, Mattera R, Hildebrandt JD, Codina J, Field JB, Birnbaumer L, Sekura RD. ADP-ribosylation of membrane components by pertussis and cholera toxin. Methods Enzymol 109:566-572, 1975.

73) Rizzoli JR, Bonjour JP. Effect of pertussis toxin on parathyroid hormone - stimulated cyclic AMP production in cultured kidney cells. J Bone Miner Res 3:605-609, 1988.