

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

22

**POSIBLE RECEPTOR TIPO β - ADRENÉRGICO
EN *Euglena gracilis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA CELULAR

P R E S E N T A

MARÍA ALICIA VEGA SEGURA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. en IBB M. Eugenia Torres Márquez

289342

MÉXICO, D.F.

2001



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a la Dra. María Eugenia Torres Márquez, por la paciencia, las enseñanzas y su confianza que ha depositado en mí, porque gran parte de lo que ahora soy, se lo debo a ella.

Agradezco al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, M. en C. Silvia Devars Ramos, M. en C. Aida Uribe Medina, M. en C. María Teresa Romero Avila, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Carlos Alberto Eslava Campos Y M. en C. Cecilia Zazueta, por sus comentarios y el tiempo dedicado para la revisión del trabajo escrito de tesis.

El desarrollo de ésta tesis fue apoyado por los Donativos 9306N y 25465N de CONACYT.

Gracias a mis padres Felipe Vega y Juana Segura por todas las experiencias, sus consejos, su paciencia, su amor y sobre todo su apoyo incondicional.

Gracias a mis hermanos Trinidad, Magdalena, Humberto, Cristina, Laura, Jorge, Teresa, Alfredo y Verónica y mis sobrinos Magaly, Nallely, Fabiola, Daniel, Oscar, por brindarme su apoyo incondicional y su enorme cariño hacia mi persona.

Gracias a mis compañeros de trabajo Alihesha y Ricardo por su compañía en el laboratorio y su amistad.

Gracias a mi amiga Leticia por su maravillosa amistad.

Gracias a mis padres: Felipe Vega y Juana Segura, por todas las experiencias, sus consejos, su paciencia, su amor y sobre todo su apoyo incondicional.

Gracias a mis hermanos: Trinidad, Magdalena, Humberto, Cristina, Laura, Jorge, Teresa, Alfredo y Verónica y mis sobrinos: Magaly, Nallely, Fabiola, Daniel, Oscar, por brindarme su apoyo incondicional y su enorme cariño hacia mi persona.

Gracias a mis compañeros de trabajo Alihesha y Ricardo por su compañía en el laboratorio y su amistad.

Gracias a mi amiga Leticia por su maravillosa amistad.

ÍNDICE

Resumen	i
Abreviaturas	iii
INTRODUCCIÓN	1
Receptor	4
Proteína G	7
Efector	9
Regulación de la actividad de los Receptores Adrenérgicos	11
<i>Euglena gracilis</i>	14
ANTECEDENTES	17
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
METODOLOGÍA	21
Cultivos	21
Curvas de crecimiento	21
Determinación de AMPc	21
Obtención de membrana plasmática de <i>Euglena gracilis</i>	22
Ensayos de unión con el radioligando	23
Estimulación de la adenilato ciclasa por análogos de GTP	23
Actividad de la paramilo fosforilasa	24
Obtención de paramilo	25
RESULTADOS	26
Figura 1. Efecto del isoproterenol sobre el crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> .	27
Figura 2. Efecto de epinefrina sobre el crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> .	28
Figura 3. Efecto del isoproterenol sobre el crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> cultivadas en medios de lactato y etanol.	29
Figura 4. Efecto de la epinefrina sobre el crecimiento de <i>Euglena gracilis</i> cultivadas en medios de lactato y etanol.	29

Figura 5. Efecto del isoproterenol sobre la densidad celular en cultivos de <i>Euglena gracilis</i> en fase estacionaria.	31
Figura 6. Efecto de la epinefrina sobre la densidad celular en cultivos de <i>Euglena gracilis</i> en fase estacionaria.	31
Figura 7. Efecto del isoproterenol sobre la acumulación de AMPc en células de <i>Euglena gracilis</i> .	33
Figura 8. Efecto de la epinefrina sobre la acumulación de AMPc en células de <i>Euglena gracilis</i> .	35
Figura 9. Ensayo de unión con el radioligando [¹²⁵ I]CYP en membranas de <i>Euglena gracilis</i> provenientes del medio glu-mal.	36
Figura 10. Estimulación de la adenilato ciclasa por análogos de GTP en membranas de <i>Euglena gracilis</i> .	38
Tabla II. Efecto de toxina del cólera sobre la acumulación del AMPc en células y la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de <i>Euglena gracilis</i> .	39
Figura 11. Degradación de paramilo en células de <i>Euglena gracilis</i> .	40
Figura 12. Actividad de la paramilo fosforilasa de <i>Euglena gracilis</i> .	41
DISCUSIÓN	42
Figura 13. Curva patrón para la determinación de AMPc	44
CONCLUSIÓN	48
BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

Los receptores β -adrenérgicos estimulan a una proteína G_s que a su vez se acopla de manera estimuladora a la adenilato ciclasa, esta enzima cataliza la conversión de ATP a AMPc. La activación del receptor conduce a la acumulación de AMPc. El incremento del segundo mensajero activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) y al fosforilar a diversas proteínas conduce a una respuesta celular. *Euglena gracilis* es un organismo fotoheterótrofo, que contiene a la enzima adenilato ciclasa, presenta variaciones de AMPc en el ciclo circadiano y un receptor intracelular de AMPc, la PKA. Al contar con estos elementos, resulta de gran interés investigar si existe un mecanismo de transducción de señales que involucre la producción de AMPc en *Euglena gracilis*.

Para explorar lo anterior, se utilizaron los agonistas adrenérgicos isoproterenol y epinefrina, que son capaces de incrementar los niveles de AMPc. Se estudio en estas células las posibles variaciones AMPc y si este segundo mensajero participa en la proliferación celular. Se encontró que el isoproterenol y epinefrina no presentan un efecto sobre la proliferación celular, solo estimulan un incremento en la densidad de la población a las 96 horas en células cultivadas en medio de glu-mal, esta respuesta se observó mejor cuando el estímulo fue dado por isoproterenol. El efecto de isoproterenol sobre la acumulación de AMPc en células *Euglena gracilis* presentó un incremento débil sobre la respuesta del segundo mensajero en fase estacionaria (96 horas), en comparación con células de mamífero. Estos efectos se sugieren como parte de una respuesta β -adrenérgico, por lo cual se deseó conocer si había y el número de estos receptores presentes en *Euglena gracilis*. Los ensayos de unión a ligando, utilizando el antagonista específico [125 I]CYP, mostraron que *Euglena gracilis* presenta un número pequeño de receptores de tipo β -adrenérgico (4.19 fmol/mg de proteína de membrana). Para transmitir la señal del receptor a la adenilato ciclasa, se requiere de la proteína G_s , misma que se detectó previamente en *Euglena gracilis* por estudios hechos en el laboratorio. Para conocer si la proteína G_s esta acoplada a la adenilato ciclasa se utilizaron análogos no-hidrolizables de

GTP (GTP γ S o GMpNHpp), que provocan la disociación de la proteína G $_s$ y su activación de manera continua. Se mostró que efectivamente, la proteína G α_s de *Euglena gracilis* está acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa. Por último se estudió si la degradación del paramilo es regulada por AMPc. Esto se determinó midiendo la degradación de paramilo en presencia de los inhibidores de fosfodiesterasas: teofilina o cafeína. Estos inhibidores mostraron efectos diferentes sobre la regulación de la síntesis o degradación de paramilo. Se midió además, la actividad de la paramilo fosforilasa en presencia del agonista β -adrenérgico. La fosforilasa se estimuló ligeramente por isoproterenol. No obstante estos datos son insuficientes para poder concluir si el AMPc tiene algún efecto a este nivel del metabolismo de *Euglena*.

Con lo anterior concluimos que *Euglena gracilis* presenta un número pequeño de receptores de tipo β -adrenérgico, una proteína acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa, pero queda por determinar el papel fisiológico de este mecanismo de transducción en el protozoario.

ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclasa
AMPc	Adenosin monofosfato 3'5'-cíclico
ATP	Adenosin trifosfato
CTX	Toxina del cólera
DG	Diacilglicerol
G $\beta\gamma$	Subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G
G α_s	Subunidades α de la proteína G _s
G _i	Proteína G perteneciente a la familia de proteínas G que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa
G _q	Proteína G perteneciente a la familia de proteínas G que activan a la fosfolipasa C
G _s	Proteína G perteneciente a la familia de proteínas G que activan a la adenilato ciclasa
GTP	Guanosin trifosfato
GTP γ S	Guanosin 5'tio-trifosfato
IP ₃	Inositol trifosfato
PK-A	Proteína cinasa A
PK-C	Proteína cinasa C
PL-C	Fosfolipasa C

INTRODUCCION

En organismos multicelulares gran cantidad de señales extracelulares son reconocidas por receptores de la membrana plasmática, que transmiten la señal al interior de la célula a través del mecanismo de transducción de la señal. La consecuencia de ésta, es la producción de segundos mensajeros como: el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), el diacilglicerol (DG), cambios en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que alcanzan un blanco final por medio de las proteínas cinasas o por modificaciones alostéricas sobre las enzimas blanco.

Los receptores que están acoplados a las proteínas G tienen siete dominios transmembranales, cuyo mecanismo de transducción de la señal involucra a tres componentes:

- i) El receptor que recibe el estímulo de la superficie celular.
- ii) La proteína G que acopla la señal recibida por el receptor y la transmite al efector.
- iii) El efector que produce el segundo mensajero en respuesta a la activación del receptor.

Los receptores adrenérgicos corresponden a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Estudios farmacológicos, fisiológicos y de biología molecular, han determinado la existencia de tres tipos: α_1 , α_2 y β . La clonación y secuenciación de los correspondientes genes y el análisis farmacológico de sus productos expresados en células transfectadas, dio como resultado la identificación de tres subtipos para cada uno de ellos denominados: $\alpha_{1A,B,D}$; $\alpha_{2A,B,C}$ y $\beta_{1,2,3}$ (Strosberg, 1993). En la tabla I se muestran algunas características de los receptores adrenérgicos, así como las propiedades farmacológicas en términos de agonistas y antagonistas selectivos para cada tipo de receptor.

Los receptores adrenérgicos transmiten la señal a través de la membrana por mecanismos diferentes (figura I). Los receptores β -adrenérgicos estimulan a la adenilato ciclasa (AC) vía proteínas Gs. La AC cataliza la conversión de ATP en

TIPO DE RECEPTOR	LONGITUD DEL PEPTIDO	POTENCIA DE AGONISTAS	POTENCIA DE ANTAGONISTAS	DISTRIBUCION DE TEJIDO (RATA)	TIPO DE PROTEINA	Sistema Efector
β_1	477	ISO>NE≥E	BETAX>>ICI118551	CORAZON, HEPATOMA AS-30d, ADIPOCITOS, CELS YUXTAGLOMERULARS DE RIÑON	G _s	↑ A C Activación de canales iónicos
β_2	413	ISO>E>NE	ICI118551> BETAX	PULMON, PROSTATA, HIGADO HIPOTIROIDEO	G _s	↑ A C ↑ canales de Ca ²⁺
β_3	402	NE>ISO>E	ICI118551>>ALP	TEJIDO ADIPOSO (blanco y café)	G _s	↑ A C
α_2^a	450	E≥ NE> UK14304	YOH>>>PRAZ	CEREBRO AORTA	G _i	↓ A C
α_{2B}	450	E≥NE> UK14304	YOH >> PRAZ	HIGADO RIÑON	G _i	↑ canales K ⁺ ↓ canales de Ca ²⁺
α_{2C}	461	E≥NE> UK14304	YOH > PRAZ	CEREBRO	G _i	↑ cambio Na ⁺ /H ⁺ ↑ fosfolipasa C, A ₂
α_{1^a}	466	OXY= A61603 >>E≥NE	PRAZ ≥ WB-4101 >NIG > 5-MU	CEREBRO, VASOS DEFERETES, PROSTATA DE MAMIFEROS	G _q	↑ fosfolipasa C ↑ fosfolipasa A ₂
α_{1B}	515	OXY>E≥ NE=A61603	PRAZ > WB-4101	HIGADO, BAZO, CEREBRO	G _q	↑ fosfolipasa C ↑ fosfolipasa A ₂
α_{1D}	560	NE≥E >OXY=A61603	BMY 7378 > PRAZ ≥ WB-4101	CEREBRO, VASOS DEFERENTES, AORTA DE RATA	G _q	↑ fosfolipasa C ↑ fosfolipasa A ₁

Tabla I.- Características de los receptores adrenergicos.

Algunas abreviaturas usadas en esta tabla son: Betaxolol (BETAX), Epinefrina (E), Norepinefrina (NE); Oxymetazoline (OXY), Prazosina (PRAZ), Yohimbina (YOH), 5-metilurapidil (5-MU), nifedipina (NIG). Tomada y modificada de Lomasney y col., 1995; Ibarra, 2000; García-Sáinz y col., 1989.

AMPC, elevando sus niveles intracelulares, este incremento activa a la proteína cinasa A dependiente de AMPC (PKA), y ésta conduce una respuesta celular al fosforilar diversas proteínas.

Los receptores α_2 adrenérgicos inhiben a la adenilato ciclasa, vía proteínas G_i, esto provoca la disminución en la producción de AMPC. La activación del receptor α_1 -adrenérgico conduce a la activación de la fosfolipasa C, vía proteínas G_q; la enzima hidroliza al fosfatidilinositol de membrana y así genera dos segundos mensajeros: el IP₃ y el DG (Strader y col., 1989; Strosberg, 1993). El IP₃ libera al calcio del retículo endoplásmico, el DG y el calcio libre estimulan algunas familias de proteínas cinasas sensibles a Ca²⁺ (por ejemplo: PKC) dando una respuesta celular.

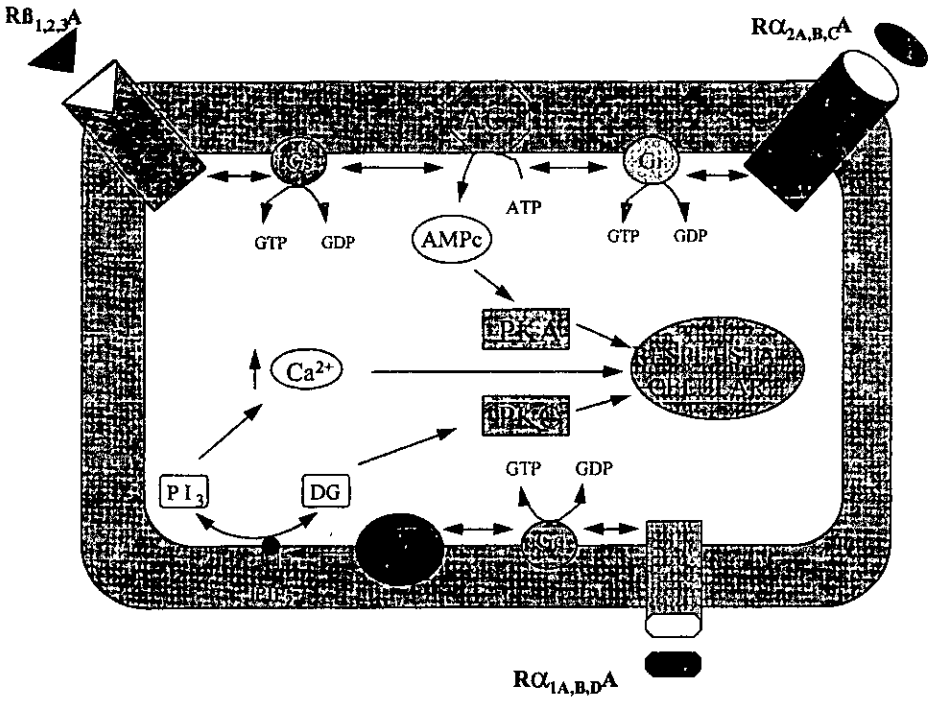


Figura 1.- Vía de transducción de señal de receptores adrenérgicos. Los receptores $\alpha_{2A,B,C}$ adrenérgicos inhiben a la adenilil ciclasa vía Gi, los receptores $\beta_{1,2,3}$ adrenérgicos estimulan a la adenilil ciclasa vía Gs y los receptores $\alpha_{1A,B,D}$ adrenérgicos estimulan a la fosfolipasa C. Las abreviaturas utilizadas en la figura son: Hormona (H), receptor α_2 -adrenérgico ($R_{\alpha_{2A,B,C}A}$), receptor $\beta_{1,2,3}$ adrenérgico ($R_{\beta_{1,2,3}A}$), receptor $\alpha_{1A,B,D}$ adrenérgico ($R_{\alpha_{1A,B,D}A}$), proteína unida a nucleótidos de guanina (Gs, Gi, Gq), adenilato ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC), fosfatidil inositol-1,4,5 trifosfato (IP_3), fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP_2), diacilglicerol (DG), proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA), proteína cinasa C dependiente de calcio (PKC). Tomada de Lomasney y col., 1995.

RECEPTOR

Los estudios bioquímicos y de biología molecular de los receptores acoplados a proteínas G, cuya estructura primaria ha sido determinada, incluyen a los receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 , β), los de visión u opsinas (Savarese y Fraser, 1992), los receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4, M5), los dopaminérgicos (D1 y D2), los serotoninérgicos (5-TH-1a y 5-TH-2), los receptores de sustancias K y P y el receptor de angiotensina entre otros. A pesar de la amplia variedad de funciones de estos receptores la semejanza estructural es considerable, lo que refleja un mecanismo de transducción común (Strader y col., 1989; Savarese y Fraser, 1992).

La estructura primaria, de los diferentes receptores acoplados a las proteínas G presenta características comunes. Todos ellos son moléculas de una cadena polipeptídica de 400 a 500 residuos, con un peso molecular de 64 a 80 kDa. El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos ha revelado la existencia de siete dominios hidrofóbicos de 20-30 aminoácidos cada uno, los cuales constituyen siete dominios espaciados en la membrana lipídica. Estos dominios transmembranales son conservados entre los diferentes miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G y están conectados por seis asas hidrofílicas de longitud variable. Además, presentan regiones amino terminal y carboxilo terminal que varían en longitud y en secuencia. La topología transmembranal que se ha propuesto para el receptor β adrenérgico se muestra en la figura II. De acuerdo con el modelo (figura II), cada uno de los siete dominios hidrofóbicos del receptor forma alfa hélices transmembranales ("tm" en figura II), con asas hidrofílicas alternadas al interior (i) y exterior (e) de la célula. La región amino terminal está expuesta sobre la cara extracelular de la membrana y la región carboxilo terminal sobre la cara citoplásmica (Strader y col., 1989; Strosberg, 1993).

Otras características que tienen estos receptores son:

a) Cuentan con secuencias consenso (N-X-S/T) para la N-glicosilación las cuales son requeridas para la expresión y funcionalidad del receptor; la delección de estos dominios llevan a la pérdida de la función.

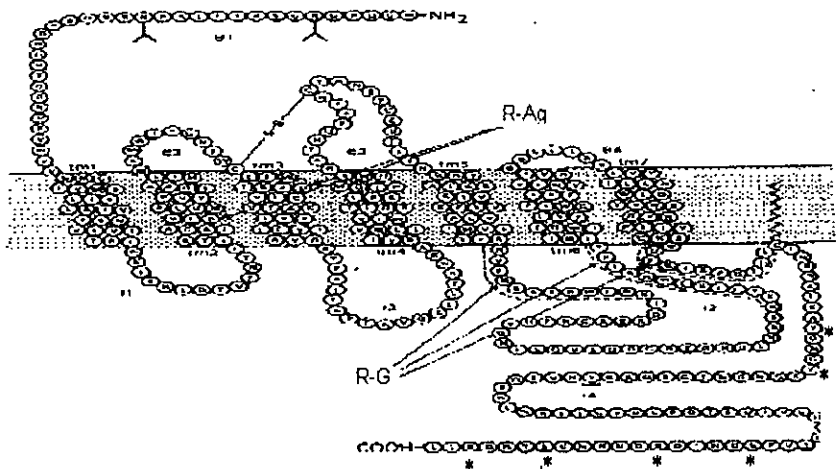


Figura II.- Receptor β_2 adrenérgico. La cadena polipeptídica está representada en la membrana. Las uniones disulfuro (S-S), involucran a los residuos Cys¹⁰⁶ y Cys¹⁸⁴. Los sitios de N-glicosilación en la región amino terminal se representan por (A). La palmitoilación del residuo de cys³⁴¹ que puede formar una cuarta asa, es indicado por (§). Las regiones de interacción del receptor con la proteína G están marcadas por—, los aminoácidos cuya presencia es indispensable se indican por las flechas R-G. Los residuos de Aspártico involucrados en la unión del agonista se indican por la leyenda R-Ag. Los residuos fosforilables están indicados con (*). Los dominios transmembranales se indican como: tm1...tm7; las asas extracelulares se indican como: e1...e4; las asas intracelulares se indican como: i1, i2, i3. Tomada de Strosberg, 1993.

b) Presentan residuos de serina y treonina en la tercera asa citoplásmica y en el carboxilo terminal, los cuales son sitios que sirven como sustrato para cinasas y fosfatasa, asimismo su fosforilación está involucrada en la desensibilización del receptor.

c) Poseen sitios conservados para modificaciones postraduccionales tal como la acilación de ácidos grasos. Tal es el caso del palmitato, que asociado a residuos de cisteína en el carboxilo terminal puede insertarse sobre la membrana formando otra asa citoplásmica; la cual puede influir sobre la movilidad del receptor y/o el acoplamiento con la proteína G. La delección de estos residuos de cisteína en el carboxilo terminal del receptor β_2 -adrenérgico, impide la formación de la cuarta asa haciendo asequibles los residuos de fosforilación, permitiendo así un mecanismo de regulación (Strosberg, 1993).

d) Forman puentes disulfuro entre los residuos conservados de cisteína (en cada una de las primeras asas extracelulares) que estabilizan la estructura funcional de la proteína. La mutación de estas cisteínas altera la función y las propiedades de unión de algunos agonistas de los receptores β -adrenérgicos, de los muscarínicos y de la rodopsina (Strader y col., 1989; Probst y col., 1992; Strosberg, 1993; Lomasney y col., 1995).

El sitio de unión del ligando al receptor adrenérgico está formado por los siete dominios transmembranales (figura III); la eliminación de los residuos amino y/o carboxilo por proteólisis (Rubenstein y col., 1987; Wong y col., 1988) o por delección (Dixon y col., 1987) produce un efecto pequeño o nulo sobre la unión del ligando al receptor adrenérgico (Strosberg, 1993).

Los residuos que componen los segmentos carboxilo y amino terminal de la tercera asa intracelular del receptor, parecen constituir el principal sitio de interacción con las proteínas G, esto fue demostrado con estudios de remplazamientos homólogos con secuencias de otros receptores y con delecciones de las regiones mencionadas (Lomasney y col., 1995).

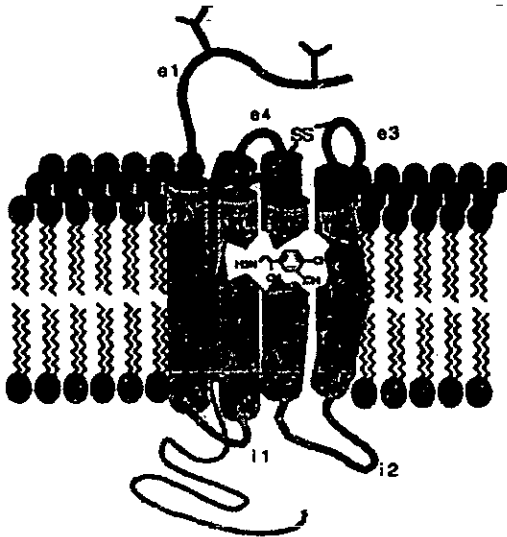


Figura III.- Modelo del receptor β -adrenérgico insertado en la membrana y la unión de un agonista. La región de unión al ligando está formado por los siete dominios transmembranales del receptor. e1,e2,e3, representan asas extracelulares; i1,i2, representan las asas intracelulares; tm1,tm2 representan los dominios transmembranales (Tomado de Strosberg, 1993).

PROTEINAS G

Las proteínas G pertenecen a la familia de proteínas que unen GTP cuyos miembros comparten características estructurales y funcionales. Todas las proteínas G asociadas a receptores de 7 dominios transmembranales son heterotriméricas, formadas por las subunidades α , β y γ , cada una codificada por distintos genes.

Se han descrito 18 isoformas de la subunidad $G\alpha$, estas presentan una masa molecular de 39 a 54 kDa, tienen la capacidad para unir nucleótidos de guanina y actividad intrínseca de GTPasa. De acuerdo a la homología en secuencia y función de la subunidad $G\alpha$ se pueden reconocer 4 familias: $G\alpha_{s/off}$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ y $G\alpha_{12/13}$. Los miembros de la familia $G\alpha_{s/off}$ estimulan a la AC, por su parte la familia $G\alpha_{i/o}$ participan en la inhibición de la AC, así como en la regulación de canales iónicos ($G\alpha_i$ activa canales de potasio y $G\alpha_o$ inhibe canales de calcio en neuronas). Los miembros de la familia $G\alpha_{q/11}$ activan la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de las isoformas β de la PLC. Los miembros de la familia $G\alpha_{12/13}$ modulan la actividad del intercambiador Na^+/H^+ . (Neer, 1995; Spiegel y col., 1995; Fields y Casey, 1997).

La subunidad β tiene una masa molecular entre 35 - 36 kDa, con al menos 5 isoformas. La subunidad γ de la cual se han identificado al menos 12 isoformas, tiene una masa molecular entre 8 - 10 kDa. Las subunidades β y γ están asociadas estrechamente, pero no de forma covalente y forman un complejo funcional $\beta\gamma$. La función de las proteínas G, es acoplar la información a través de la membrana plasmática entre receptores y efectores. Estas actúan como una molécula de encendido y apagado, gobernadas por el ciclo de la proteína G, (figura IV) (Gilman, 1987; Spiegel y col., 1992; Clapham, 1996).

La región de interacción del receptor-proteína G ocurre entre la segunda y la tercera asa intracelular y el carboxilo terminal del receptor (Lomasney y col., 1995).

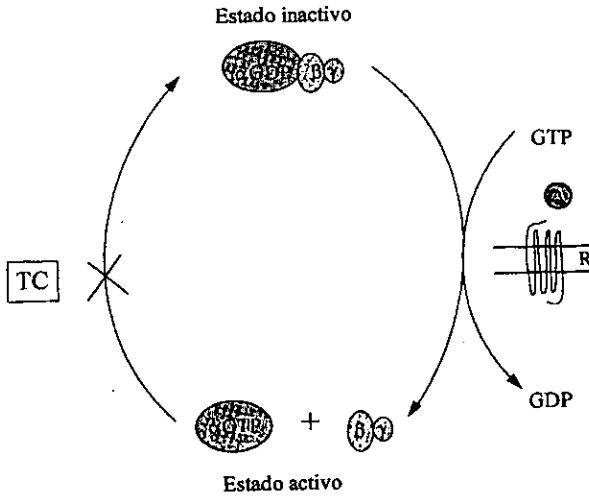


Figura IV.- El ciclo de la proteína G. En su estado basal (estado inactivo), la subunidad α de las proteínas G triméricas está unida a GDP y ésta se asocia en forma de un heterotrímero con el complejo $\beta\gamma$. La unión de un agonista específico a su receptor conduce al intercambio de GDP por GTP. La unión $G\alpha$ -GTP conduce a la disociación del receptor y del complejo $\beta\gamma$. Así la subunidad $G\alpha$ -GTP y el complejo $\beta\gamma$ interactúan con algunos efectores. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad conduce a la hidrólisis de GTP a GDP + Pi, esto causa la disociación de la subunidad α del efector y su reasociación con el complejo $\beta\gamma$. La formación del heterotrímero se requiere para el acoplamiento de la proteína G con el receptor.—Toxinas bacterianas como la "toxina del cólera" (TC) modifican covalentemente a la subunidad α y por lo tanto alteran la transducción de la señal. (Tomado de Spiegel y col., 1992)

Para el estudio de las proteínas G se han empleado productos de diferente tipo y origen.

1.- Algunas toxinas bacterianas modifican la función de la proteína G, estas transfieren un grupo de ADP-ribosa del NAD^+ a un aminoácido específico en la subunidad α .

a) La toxina del cólera transfiere la ADP-ribosa al residuo de arginina 201 en la subunidad $G\alpha_s$, impidiendo la reasociación de las subunidades $G\alpha$ con $G\beta\gamma$, por la inhibición de la actividad de GTPasa lo que ocasiona la unión permanente a GTP,

causando una activación constante de la subunidad $G\alpha_s$. Esto provoca el aumento en la actividad de la adenilato ciclasa (figura IV) y por consiguiente la acumulación de AMPc (Spiegel y col., 1992).

b) La toxina pertussis transfiere la ADP-ribosa al residuo de cisteína 347 en la región carboxilo terminal de la subunidad $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, causando un desacoplamiento del receptor con la proteína G, lo que provoca una activación continua de la adenilato ciclasa. Esta modificación covalente (figura IV) no previene la disociación del trímero, es decir, no afecta la actividad de GTPasa (Huff y Neer, 1986; Spiegel y col., 1992).

2.- El mastoparan, es un péptido que forma una α hélice anfifílica, capaz de activar directamente a la proteína (G_o , G_i) (Higashijima y col., 1988, 1990; Probst y col., 1992).

3.- Los análogos no hidrolizables de GTP promueven la activación continua de la proteína G.

4.- Los iones fluoruro (en forma de complejo fluoruro de aluminio) también causan una activación de la proteína G (Spiegel y col., 1992).

EFECTOR

Los sistemas efectoros a quienes la proteína G acopla con su receptor, incluyen, a la adenilato ciclasa, a la fosfolipasa C y algunos canales de Ca^{2+} y K^+ .

La adenilato ciclasa es una enzima transmembranal que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP. La enzima tiene una masa molecular aproximada de 120 kDa constituida de 1064-1248 aminoácidos aproximadamente. Su estructura tridimensional (figura V) sugiere una región amino terminal citoplásmica corta y dos dominios citoplásmicos (C1 y C2) aproximadamente de 40 kDa, antes de cada dominio se encuentra una región hidrofóbica (M1 y M2); cada una de las cuales esta constituida por seis hélices transmembranales, (Taussig y Gilman, 1995).

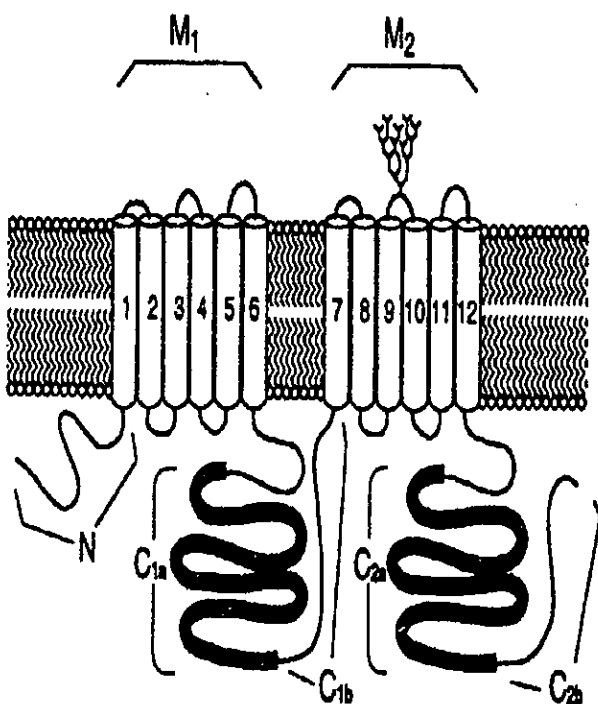


Fig. V.- Estructura de la adenilato ciclasa. Los cilindros muestran los dominios transmembranales, la línea oscura indica la región de aminoácidos altamente conservados entre las familias de la adenilato ciclasa. Las abreviaturas utilizadas en la figura son: N, dominio amino terminal; M1, primer dominio transmembranal; C1a y C1b, la primer asa citoplásmica larga; M2, segundo dominio transmembranal; C2a y C2b, la segunda asa citoplásmica larga y (Y) residuos glicosilados. Tomada de Taussig y Gilman 1995.

En mamíferos, se conocen al menos 10 isoformas de la adenilato ciclasa, éstas son reguladas por numerosas hormonas y neurotransmisores vía receptores acoplados a proteínas G, de manera estimuladora (G_s) o inhibitoria (G_i). Estudios de la regulación de las isoformas de adenilato ciclasa de mamífero describen la presencia de características comunes. Todas las isoformas son activadas por

forskolina y por la subunidad $G\alpha_s$ unida a GTP (Tang y Gilman, 1992; Taussig y Gilman, 1995)

Todas las adenilato ciclasas de mamífero, son inhibidas por algunos análogos de adenosina, conocidos como inhibidores de sitio P; por ejemplo el 2'-deoxiadenosina. Las diferentes adenilato ciclasas de mamífero presentan patrones de regulación específicos, algunas son modificadas por el complejo $G\beta\gamma$ y otras son estimuladas por Ca^{2+} -calmodulina. Otras más son reguladas por proteínas cinasas A o por cinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina, (Tang y Gilman, 1992; Taussig y Gilman, 1995).

Regulación de la actividad de los receptores adrenérgicos

La eficacia con la cual los receptores adrenérgicos transducen las señales extracelulares es regulada dinámicamente. Existen mecanismos de control que por un lado, permiten que la célula responda rápidamente al agonista y por el otro, le permitan mantener un nivel de respuesta menor ante un estímulo prolongado. La estimulación prolongada del receptor es seguida por una disminución en la sensibilidad al agonista (desensibilización). Los receptores β -adrenérgicos, en particular el subtipo β_2 , se han utilizado como sistema modelo para el estudio de los mecanismos que participan en la desensibilización (Lomasney y col., 1995).

Se han identificado dos patrones generales de desensibilización: a) la desensibilización homóloga que se caracteriza por una disminución de la respuesta del receptor ocupado por el agonista y b) la desensibilización heteróloga en la cual la estimulación de un receptor por su agonista disminuye la respuesta de otros receptores que comparten el mecanismo de transducción, desde la proteína G hacia abajo de la cascada.

En la desensibilización homóloga intervienen 3 procesos importantes: El desacoplamiento rápido (segundos a minutos), se da entre el receptor y la proteína G; sin pérdida en el número de receptores. Un evento fundamental que interviene en la desensibilización rápida es la fosforilación del receptor (figura VI), esta fosforilación se lleva a cabo por al menos dos clases de cinasas que

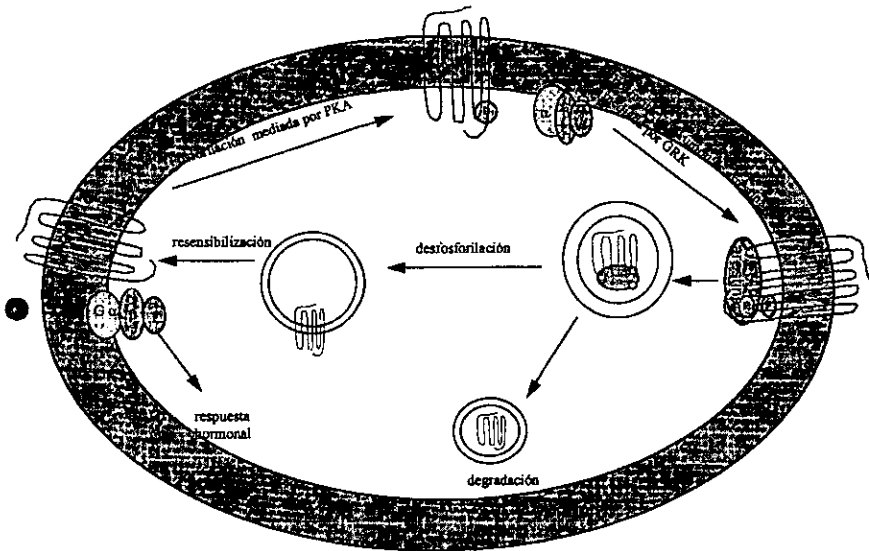


Figura VI.- Regulación de la función del receptor adrenérgico. El mecanismo de desensibilización es mediado por proteínas específicas del receptor (GRKs) y por proteína cinasa A dependiente de AMPc (PKA) vía fosforilación. Modificada de Lomasney y col., 1995; Lefkowitz, 1998).

fosforilan residuos de serina y treonina: las cinasas activadas por segundos mensajeros (PKA y PKC) y las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Se han identificado 6 miembros de las GRKs (GRK1-6), quienes se caracterizan por reconocer y fosforilar sólo a los receptores en su forma activa. La fosforilación del receptor por las GRKs produce el desacoplamiento parcial de las proteínas G y permite la interacción de las proteínas reguladoras, arrestinas; estas al unirse al receptor fosforilado impiden el acoplamiento del receptor con las proteínas G. Se han identificado dos miembros de las arrestinas que participan directamente en la desensibilización de los receptores β -adrenérgico, la β -arrestina 1 y la β -arrestina 2. En la mayoría de los receptores acoplados a proteínas G los sitios potenciales de fosforilación por GRKs se localizan en el carboxilo terminal y en un subgrupo de ellos (M_1 , M_2 , α_{2A} - adrenérgico) en la tercera asa intracelular.

Estas regiones participan en el acoplamiento del receptor con la proteína G, como se ilustró en la figura II. La desensibilización homóloga de los receptores β_1 - y β_2 -adrenérgicos puede ser mediada por la PKA y por las GRKs. Ambos subtipos de receptores contienen la secuencia de aminoácidos RRSS, que es la secuencia consenso para la acción de PKA, en la tercera asa intracelular y en el extremo carboxilo terminal. La PKA actúa preferentemente en el sitio de la tercera asa intracelular, mientras que la GRK2 y la GRK3, tienen sus sitios blanco para la fosforilación en el carboxilo terminal (Lefkowitz, 1998). Los receptores β_2 -adrenérgico presentan dos sitios consenso para la fosforilación por PKC uno localizado en la tercera asa intracelular y el otro en el carboxilo terminal. La participación de PKC en la regulación de la actividad del receptor se ha estudiado en células tratadas con ésteres de forbol, como el 4 β -forbol 12-miristato 13-acetato (TPA), que activa directamente a la enzima (Böhn y col., 1997).

b) El secuestro de receptores, a los pocos minutos de estimulación por el agonista, se da como consecuencia de la internalización de éstos a compartimentos intracelulares, y por ende permanecen inaccesibles al agonista. Durante la estimulación del receptor por el agonista las β -arrestinas son translocadas a la membrana plasmática, en donde se unen al receptor fosforilado y lo desacoplan de la proteína G, dando como resultado el inicio de la internalización. El complejo receptor fosforilado- β -arrestina se une a moléculas de clatrina, formando así vesículas cubiertas de clatrina ó endosomas. La disminución del pH endosomal promueve la asociación de la fosfatasa con el receptor y su desfosforilación subsecuente (figura VI). A su vez las β -arrestinas pueden ser desfosforiladas y regresar a la membrana plasmática para interactuar con otro receptor fosforilado. Posteriormente el receptor es reciclado a la membrana plasmática para iniciar un nuevo ciclo de activación y desactivación, (Lomasney y col., 1995; Lefkowitz, 1998).

c) La regulación por disminución de receptores de membrana (figura VI), que se da después de la estimulación prolongada por el agonista (horas), se ocasiona por la reducción en su síntesis o el aumento en su degradación, (Krupnic y Benovic, 1998).

Euglena gracilis

a) Generalidades

Euglena gracilis (figura VII) es un organismo unicelular, con una longitud variable de aproximadamente 10- hasta 500- μm que puede crecer de manera autótrofa o de manera heterótrofa con diferentes fuentes de carbono.

E. gracilis tiene en la parte anterior una invaginación que consiste de un canal estrecho, por donde entra el alimento, que se expande posteriormente formando un reservorio en donde se vacía la vacuola contractil. También se pueden apreciar otros organelos tales como: el flagelo, el núcleo, el nucleolo, los cloroplastos, las mitocondrias y la mancha ocular (figura VII).

Las células son delimitadas por una membrana plasmática, la cual presenta una serie de "tiras" (strips) flexibles, hechas de mucoproteínas con una disposición helicoidal. Estas estructuras junto con la membrana plasmática, forman una película que en comparación con la pared celular rígida de plantas, permite a las células de *E. gracilis* cambiar su forma. Adyacente a la película se encuentran mucosistos los cuales secretan material mucoso o mucilago que tiene la función de lubricar entre los surcos o estrías de las ondulaciones durante las contracciones. Otra característica única de la película es su alto contenido de carbohidratos. La pentosa y la metilpentosa componen el 80% del total de azúcares de las membranas, además presenta el aminoazúcar glucosamina. La proporción proteína-lípidos de la membrana de *Euglena gracilis* es de 3-8, la cual es alta cuando se compara con la de las membranas celulares de otros eucariotas que varía entre 1.0 y 2.0 (Nakano y col., 1987; Uribe, 1992).

El genero *Euglena sp.* presenta una distribución amplia en hábitats como: agua dulce, salobre, ácida ó alcalina, ya sea en condiciones aerobicas ó anaeróbicas.

Euglena gracilis es un organismo muy interesante por su origen y por sus características compartidas con animales y plantas superiores. Cuando se cultivan en presencia de luz desarrollan cloroplastos y al igual que las plantas, realizan fotosíntesis utilizando agua y CO_2 como sustratos y liberando O_2 ; sin

embargo, la fotosíntesis no es capaz de mantener el crecimiento pues necesitan vitamina B₁₂, aminoácidos y una fuente de carbono. Sus cloroplastos son muy similares a los que presentan las algas verdes, excepto por la membrana que los cubre: la cual es doble en algas verdes y triple en *Euglena gracilis*. Poseen clorofila a y b, β-carotenos y derivados caratenoides (alozantinas, anteroxantina, astraxantina). A semejanza con las células animales presenta mitocondrias, las cuales tienen una superficie irregular y varían en tamaño y cantidad según el volumen de citoplasma (Uribe, 1992).

A diferencia de animales y plantas, *Euglena gracilis* sintetiza paramilo un polímero glucosídico con enlace β-1-3 entre los monosacáridos (Buetow, 1968).

Su reproducción es asexual por fisión longitudinal binaria con división semitrogénica; es decir, produce células hijas en imagen especular, el tiempo de división varía de 10 a 14 horas dependiendo de la fuente de carbono (Buetow, 1968).

b) Taxonomía

El género de *Euglena* presenta problemas para su taxonomía por el hecho de presentar características animales y vegetales, como es la presencia de una envoltura compleja o pellicula y de cloroplastos, por lo que, han sido ubicados tanto en el Reino Animal como en el Reino Vegetal.

Los zoólogos la han ubicado en el Phylum protozoa, clase Phytomastigophorea. Desde el punto de vista botánico *Euglena gracilis* pertenece a la división Euglenophyta.

Por otra parte, si se considera como organismo protista, la clasificación de *Euglena* (Uribe, 1992) sería:

Reino: Protista
Phylum: Sarcomastogophora
Subphylum: Mastigophora
Clase: Phytomastigophorea
Orden: Euglenidae
Género: *Euglena*

Especie: *gracilis*

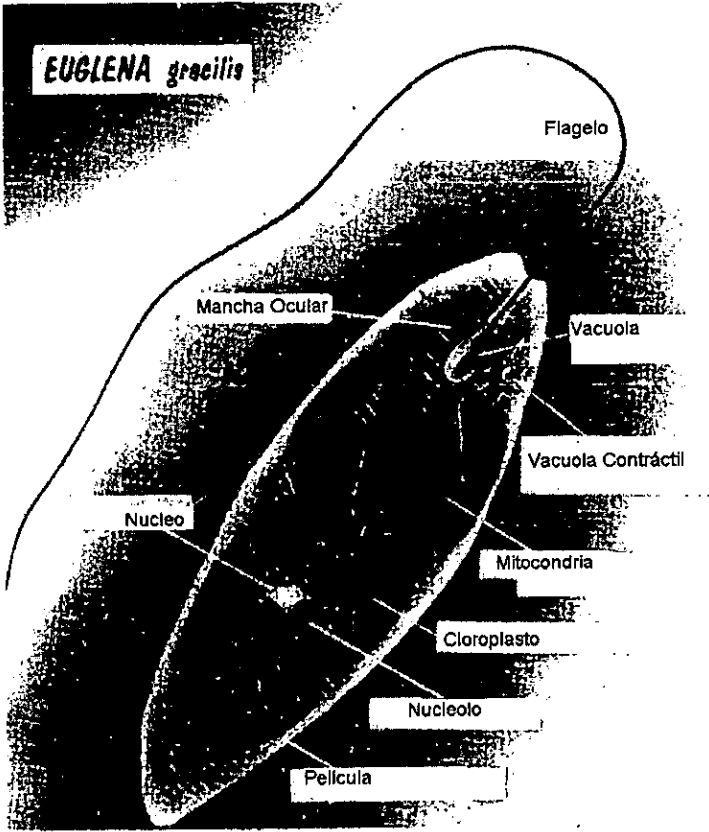


Figura VII. Representación esquemática de *Euglena gracilis*. Se indican sus organelos (Tomada de Wolken, 1967).

Antecedentes

Existen diversas evidencias que sugieren un mecanismo de transducción mediado por el AMPc en *Euglena gracilis*, como son las que a continuación se refieren:

1) La existencia de variaciones en los niveles de AMPc, en el ciclo circadiano, aunque se desconocen los mecanismos que lo regulan. Trabajos realizados por Carré y col. (1989) señalan la existencia de altos niveles de AMPc (en un intervalo de 10 a 40 pmol/10⁶ células) en *Euglena gracilis*. Al respecto se encontró que en células expuestas a periodos de luz-obscuridad (de 12 h. de luz y 12 h. de obscuridad), el AMPc celular presenta una oscilación bimodal en un periodo circadiano (aproximadamente 24 h) y con un intervalo de 5 a 20 pmol/10⁶ células. Se registraron niveles más altos de AMPc tanto al inicio del periodo de luz (0-2 h) como del periodo de obscuridad (12-14 h). Se observó que, la variación de la cantidad de AMPc no depende del periodo de luz-obscuridad ya que en obscuridad se sigue observando. En organismos multicelulares el AMPc juega un papel importante en el encendido de varias actividades celulares; tales como motilidad, división celular, fototaxis y un sin número de actividades enzimáticas. Como ejemplo de éstas actividades enzimáticas, están la glucógeno sintetasa y la glucógeno fosforilasa. En *Euglena gracilis* se desconoce aún que procesos celulares son regulados por este segundo mensajero.

2.- Se ha detectado y semipurificado una proteína cinasa A, que es el receptor intracelular de AMPc (Carré y col., 1992). Esto sugiere que la señal del segundo AMPc se está traduciendo en una respuesta celular.

3.- Mientras que las adenilato ciclasas de mamíferos son estimuladas por una variedad de hormonas, prostaglandinas, catecolaminas y neurotransmisores, en *Euglena gracilis* se ha encontrado una adenilato ciclasa que es ligeramente estimulada por catecolaminas (epinefrina y serotonina) y prostaglandinas (Keirns y col., 1973).

4.- En otros organismos cercanos como en *Tetrahymena* se ha detectado la síntesis de norepinefrina y epinefrina, y en *Crithidia* la norepinefrina (Janakidevi y

col., 1966). Lo anterior sugiere, que algunos flagelados de vida libre son capaces de sintetizar catecolaminas, lo que nos hace suponer que ya a éste nivel filogenético se generan señales de tipo hormonal.

5.- Otra evidencia que apoya la existencia de un mecanismo de transducción hormonal en protozoarios es la obtenida con estudios de asociación con un ligando marcado radiactivamente, realizados en el parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*. En este organismo se encontró un receptor tipo β -adrenérgico (De Castro y Olivera, 1987).

El AMPc juega un papel esencial controlando muchas de las actividades de las células eucariotas y células procariotas, por ejemplo en la levadura *S. cerevisiae* el AMPc es requerido para el crecimiento (Matsumoto y col., 1985). En vertebrados, el AMPc intracelular puede mediar varias de las señales hormonales que regulan el metabolismo y la proliferación celular.

El polisacárido de reserva en células animales es el glucógeno, éste es utilizado cuando la célula se encuentra en condiciones de ayuno. La degradación del glucógeno se lleva a cabo por la enzima glucógeno fosforilasa, la cual es regulada alostérica o covalentemente por calcio y por PKA, respectivamente (Lenhinger, 1993). *Euglena gracilis* acumula paramilo como reserva energética, este es un polímero de glucosa con uniones beta 1,3; es posible que la presencia de catecolaminas en protozoarios sirva para regular la cantidad de polisacáridos de reserva de una forma similar como a la que se lleva a cabo en mamíferos, lo que sugiere un tipo de regulación metabólica.

Hipótesis

Si *Euglena gracilis* presenta procesos que son regulados por AMPc, entonces puede contener los elementos de éste sistema de transducción. Dado que algunos protozoarios sintetizan catecolaminas, entonces el receptor podría ser uno del tipo β -adrenérgico. Otro de los elementos del sistema transductor que no se ha explorado en *Euglena gracilis* es la proteína G_s que también esperamos que esté presente para establecer la conexión con el receptor y la adenilato ciclasa.

Una hipótesis más es que los cambios en los niveles de AMPc (estimulados por agonistas β -adrenérgicos) participen en la regulación de la proliferación y el metabolismo (síntesis y degradación de paramilo) de *Euglena gracilis*.

OBJETIVO GENERAL

Explorar la presencia de un mecanismo de transducción de señales que involucre la producción de AMPc en *Euglena gracilis* y conocer si esta señal es generada por un receptor tipo β -adrenérgico.

OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar el efecto de isoproterenol y epinefrina (agonistas β -adrenérgicos) en la proliferación celular de *Euglena gracilis*.
- Determinar el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y epinefrina) en la acumulación de AMPc en células de *Euglena gracilis*, en fase estacionaria.
- Cuantificar el número de receptores β -adrenérgicos presentes en *Euglena gracilis*.

Hipótesis

Si *Euglena gracilis* presenta procesos que son regulados por AMPc, entonces puede contener los elementos de éste sistema de transducción. Dado que algunos protozoarios sintetizan catecolaminas, entonces el receptor podría ser uno del tipo β -adrenérgico. Otro de los elementos del sistema transductor que no se ha explorado en *Euglena gracilis* es la proteína G_s que también esperamos que esté presente para establecer la conexión con el receptor y la adenilato ciclasa.

Una hipótesis más es que los cambios en los niveles de AMPc (estimulados por agonistas β -adrenérgicos) participen en la regulación de la proliferación y el metabolismo (síntesis y degradación de paramilo) de *Euglena gracilis*.

OBJETIVO GENERAL

Explorar la presencia de un mecanismo de transducción de señales que involucre la producción de AMPc en *Euglena gracilis* y conocer si esta señal es generada por un receptor tipo β -adrenérgico.

OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar el efecto de isoproterenol y epinefrina (agonistas β -adrenérgicos) en la proliferación celular de *Euglena gracilis*.
- Determinar el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y epinefrina) en la acumulación de AMPc en células de *Euglena gracilis*, en fase estacionaria.
- Cuantificar el número de receptores β -adrenérgicos presentes en *Euglena gracilis*.

Hipótesis

Si *Euglena gracilis* presenta procesos que son regulados por AMPc, entonces puede contener los elementos de éste sistema de transducción. Dado que algunos protozoarios sintetizan catecolaminas, entonces el receptor podría ser uno del tipo β -adrenérgico. Otro de los elementos del sistema transductor que no se ha explorado en *Euglena gracilis* es la proteína G_s que también esperamos que esté presente para establecer la conexión con el receptor y la adenilato ciclasa.

Una hipótesis más es que los cambios en los niveles de AMPc (estimulados por agonistas β -adrenérgicos) participen en la regulación de la proliferación y el metabolismo (síntesis y degradación de paramilo) de *Euglena gracilis*.

OBJETIVO GENERAL

Explorar la presencia de un mecanismo de transducción de señales que involucre la producción de AMPc en *Euglena gracilis* y conocer si esta señal es generada por un receptor tipo β -adrenérgico.

OBJETIVO PARTICULARES

- Determinar el efecto de isoproterenol y epinefrina (agonistas β -adrenérgicos) en la proliferación celular de *Euglena gracilis*.
- Determinar el efecto de los agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y epinefrina) en la acumulación de AMPc en células de *Euglena gracilis*, en fase estacionaria.
- Cuantificar el número de receptores β -adrenérgicos presentes en *Euglena gracilis*.

- Determinar el acoplamiento de la proteína G_s con la adenilato ciclasa.
- Determinar si la degradación del paramilo en *Euglena gracilis* es regulada por AMPc.
- Estudiar el efecto de un agonista β -adrenérgico sobre la actividad de la paramilo fosforilasa de *Euglena gracilis*.

METODOLOGÍA

Cultivos

Euglena gracilis fue cultivada axénicamente en un medio orgánico que contenía como fuente de carbono: glutamato-malato (glu-mal) 34 y 15 mM respectivamente, ó lactato 36 mM ó etanol 200 mM como lo reportan Moreno-Sánchez y Raya (1987), en ausencia de luz, con agitación constante (140 r.p.m.) a temperatura ambiente.

Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se iniciaron con 2×10^5 células, en ausencia (control) o en presencia isoproterenol o epinefrina a concentraciones desde 10^{-6} hasta 10^{-4} M. El isoproterenol se adicionó cada tercer día y la epinefrina se adicionó diariamente, debido a que se oxida rápidamente. Se tomaron diariamente alícuotas de 100 μ l de cada cultivo, se diluyeron (1:10) en agua y se les adicionó HCl 1% (v/v) para inmovilizar a las células y realizar el conteo. Este se realizó en una cámara de Neubauer por medio de un microscopio de contraste de fases.

Determinación de AMPc

Las células de *E. gracilis* cultivadas en medio de glu-mal, lactato ó etanol, se cosecharon en fase estacionaria (4 días de cultivo), se lavaron y resuspendieron con una solución amortiguadora de fosfatos (KH_2PO_4 10 mM, pH 7). Se utilizó una concentración de 2×10^7 células /ml para la curva dosis respuesta a los agonistas adrenérgicos (isoproterenol ó epinefrina). El intervalo de concentraciones de los agonistas fue de 10^{-8} a 10^{-4} M, el ensayo se realizó por 2 min en presencia de 3-Isobutil-1-metilxantina, un inhibidor de fosfodiesterasas de

AMPc. La reacción se terminó con la adición de HCl [10 mM]_f y se hirvieron durante 10 min. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo durante 15 min, se centrifugaron y el sobrenadante se transfirió a otros tubos donde se le ajustó el pH entre 6-7.5, con NaOH 1N. La cantidad de AMPc en cada muestra se determinó por medio de radioinmunoensayo (Rianen cAMP ([¹²⁵I] radioinmunoassay kit adenosine 3', 5'cyclic monophosphate, Amersham). La determinación se basa en la competencia por los sitios de unión al anticuerpo anti-AMPc, del AMPc formado con el [¹²⁵I] AMPc adicionado como estándar. Se realiza al mismo tiempo una curva patrón de desplazamiento que permite determinar por interpolación la concentración del nucleótido desplazado. La emisión de radiactividad fue evaluada en un contador de radiación gamma, (Beckman clase 5000).

Obtención de membrana plasmática de *Euglena gracilis*

Para obtener las membranas de *Euglena gracilis* se siguió el método propuesto por Nakano y col. (1987), con algunas modificaciones, como se describe brevemente. Las células de *Euglena gracilis* provenientes del medio glumal, se cosecharon después de 4 días de crecimiento (fase estacionaria), y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄ 10 mM a pH 7), posteriormente se les adicionó una solución amortiguadora de lisis (KH₂PO₄ 2 mM, sacarosa 0.3 M, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM y β-mercaptoetanol 0.1%, pH 7.2), se sonicaron en hielo con un sonicador Branson con una amplitud de 20-25 micrones, con intervalos de 30/60 seg c/u, 5 veces. Se centrifugó por 10 minutos a 1,000 X g para eliminar las células que no se rompieron y el paramilo. El sobrenadante se colocó en un gradiente discontinuo de sacarosa de 2.4/1.9/1.4 M en relación 3:2:2 y se centrifugó a 92,000 X g durante 45 min. La interfase del gradiente entre 2.4/1.9 M de sacarosa, se colectó y se lavó dos veces con solución amortiguadora de Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM a pH 7.4 (Tris-Mg²⁺) a 27,000 X g durante 30 min. El sedimento se resuspendió en el menor volumen posible con amortiguador Tris-

Mg²⁺, las membranas obtenidas se guardaron a -70 °C. La proteína se determinó por el método de Lowry y col. (1951) utilizando como estándar albúmina de suero de bovino.

Ensayos de unión con radioligando

Estos ensayos se realizaron como lo describen García-Sainz y col., (1989). A una solución amortiguadora Tris-Mg²⁺ (Tris 50 mM, MgCl₂ 10mM, pH 7.4), se añadió propanolol 10 μM, éste es un antagonista β-adrenérgico utilizado para determinar el pegado total del ligando a los receptores, y [¹²⁵I]ICYP en un intervalo de concentraciones de 25 a 800 pM, éste antagonista β-adrenérgico se utilizó para determinar el pegado total a los receptores; el volumen final fue de 250 μl. El ensayo se inició con la adición de 50 μl de membranas (200-300 μg de proteína) de *Euglena gracilis*, que se incubaron durante 45 min. a 37 °C. La reacción se detuvo por dilución con la solución amortiguadora Tris-Mg²⁺ y su filtración rápida a través de filtros de fibra de vidrio (Gelman Sciences P/N 66213, 25mm), utilizando un cosechador de células, Brandel 48-R. Los filtros se lavaron cuatro veces con la misma solución amortiguadora y se transfirieron a viales para determinar la radiactividad, retenida en los filtros, en un contador de radiación gamma (Beckman clase 5000).

La curva de saturación y el análisis de Scatchard se realizó con el programa LIGAND 2.0 de McPherson G.A.

Estimulación de la adenilato ciclasa por análogos de GTP

La actividad de adenilato ciclasa se determinó por la producción de AMPc a partir de [^α³²P] ATP, el AMPc se cuantificó por el método de Salomon y col. (1974), como se describe a continuación:

El medio de reacción está compuesto por un sistema de regeneración de ATP (fosfocreatina 20 mM, creatina cinasa 0.8 U/ml), ATP 20 nM, [³²P] ATP 1 μCi/tubo, teofilina 10 mM (inhibidor de fosfodiesterasas), la solución amortiguadora (Tris-HCl 25 mM, MgCl₂ 5mM pH 7.5) y los análogos de GTP a la concentración indicada en un rango de 10⁻⁸ - 10⁻⁴ M. La reacción se inició con la adición de membranas (50 μg de prot.) de *Euglena gracilis*, se incubó en agitación a temperatura ambiente. Después de 20 min. se adicionó 1 ml de SDS 1% para parar la reacción y se adicionaron 10 μl [2,8-³H] AMPc (aproximadamente 28,500 cpm, 50 Ci/mmol; 254 fmol/tubo), como estándar, se agitó y se adicionó en columnas de 0.4 X 15 cm que contenían un ml de resina Dowex previamente activada con 1 N de HCl, el eluido de ésta y un lavado de 2 ml de agua se desecharon, se colocaron las columnas de Dowex sobre las de alúmina que previamente fueron lavadas con 8 ml de imidazol 0.1 M, azida de sodio a pH 8, se agregaron 3 ml de agua, se adicionó 4 ml de imidazol 0.1 M. y se colectó esta fracción en viales a los que se les añadió líquido de centelleo; se cuantificó la radiactividad en un contador de centelleo (Beckman clase 156000TSA).

Actividad de la paramilo fosforilasa

Las células de *Euglena gracilis* se cosecharon y se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄ 10 mM a pH 7). Se le adicionó a las células 100 μl de mezcla de incubación (KH₂PO₄ 10 mM, BSA 18%, Piruvato 0.1 M, Lactato 1 M), y se incubaron durante 20 min a 30 °C. Se adicionó el agonista (isoproterenol 10⁻⁸ a 10⁻⁵ M), y se incubaron por 10 min. De esta mezcla se tomaron 25 μl y se adicionaron a un tubo que contenía 100 μl del siguiente medio: MES 10 mM, NaF 50 mM, EDTA 10 mM, β-glicerofosfato 25 mM, 25 μl de digitonina (10 mg/ml), este paso se realizó en baño de hielo.

La actividad enzimática de las muestras obtenidas, se determinó en una mezcla que contenía (glucosa-1P 100mM, paramilo 25 mg/ml, NaF 17 μM, cafeína 1 mM pH 6), de esta solución se tomaron 650 μl y se le adicionaron 5.5 μCi de

^{14}C -glucosa. Cada tubo con 25 μl de mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 37 °C, se adicionaron las muestras obtenidas y se incubaron durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo al agregar 25 μl de ácido acético glacial y los productos de la reacción se absorbieron en papel filtro tipo Whatman 3 MM, los filtros con las muestras se lavaron con etanol al 66% durante 20 min (dos veces) y una vez más con acetona. Una vez deshidratados los filtros se secaron, se colocaron en viales, se les adicionó líquido de centelleo y se les midió la radiactividad en un contador de centelleo (Beckman clase 156000TSA).

Obtención de paramilo

El paramilo se obtuvo siguiendo el método reportado por Yokota y col (1982) con algunas modificaciones como se describe a continuación. Las células de *Euglena gracilis* se cosecharon por centrifugación y se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos, como se describió anteriormente. Posteriormente, se lisaron con un sonicador Branson a una amplitud de 20 a 25 micrones, durante 3 min con intervalos de 30 seg en baño de hielo. El lisado se centrifugó durante 20 min a 1,200 X g y se conservó el precipitado que contenía al paramilo. El paramilo se disolvió en SDS al 1% (p/v) y se hirvió por 5 min para disolver los pigmentos contaminantes y se centrifugó. Posteriormente, se sedimentó y lavó, primero con SDS al 0.1 % hasta eliminar los pigmentos (3-4 veces) y posteriormente con H_2O destilada

RESULTADOS

En las curvas de crecimiento de *Euglena gracilis* (Figura 1 A, B y C) realizadas en medio de glu-mal, se observa que el isoproterenol no tiene efecto en la proliferación celular a ninguna de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, la densidad poblacional a las 96 h presenta un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.005$) cuando el isoproterenol se utiliza a concentraciones de 1 y 10 μM (1A y 1B).

En la figura 2 (A, B y C) se muestra las curvas de crecimiento de *Euglena gracilis* cultivadas en medio de glu-mal en ausencia (control) y en presencia de epinefrina (el agonista adrenérgico natural) a concentraciones de 1, 10 y 100 μM . Cuando las células se encuentran en presencia de epinefrina 1 μM , se observa un incremento en la densidad poblacional a las 72 y 96 h, sin embargo cuando la epinefrina se da a una concentración de 10 y 100 μM no se observa ningún efecto.

Una característica de *Euglena gracilis* es que puede crecer en diferentes fuentes de carbono. Para evaluar si la expresión de un receptor β -adrenérgico en *Euglena gracilis* pudiera estar relacionado con la adaptación al medio o a una determinada fuente de carbono. Se cultivaron las células en medios que contenían lactato o etanol, como fuente de carbono, en presencia de 1 μM isoproterenol (Figura 3). El resultado obtenido mostró que en las células cultivadas en medio de lactato, en presencia de isoproterenol 1 μM (Figura 3 A), o epinefrina 1 μM (Figura 4A), el crecimiento no se ve afectado con respecto a las células control y solo se observa un incremento de la densidad poblacional a las 96 h; de forma similar a la observada en células crecidas en glu-mal. Cuando las células son cultivadas en medio de etanol en presencia de isoproterenol se observa una disminución de la población a partir de las 72 h, ésta disminución permanece también a las 96 h con respecto al control (Figura 3 B).

Cuando el estímulo es dado por epinefrina 1 μM , el crecimiento de las células en medio de lactato (Figura 4) no se afecta, solo se observa una disminución de la población a las 72 h, pero a las 96 h la población de células es

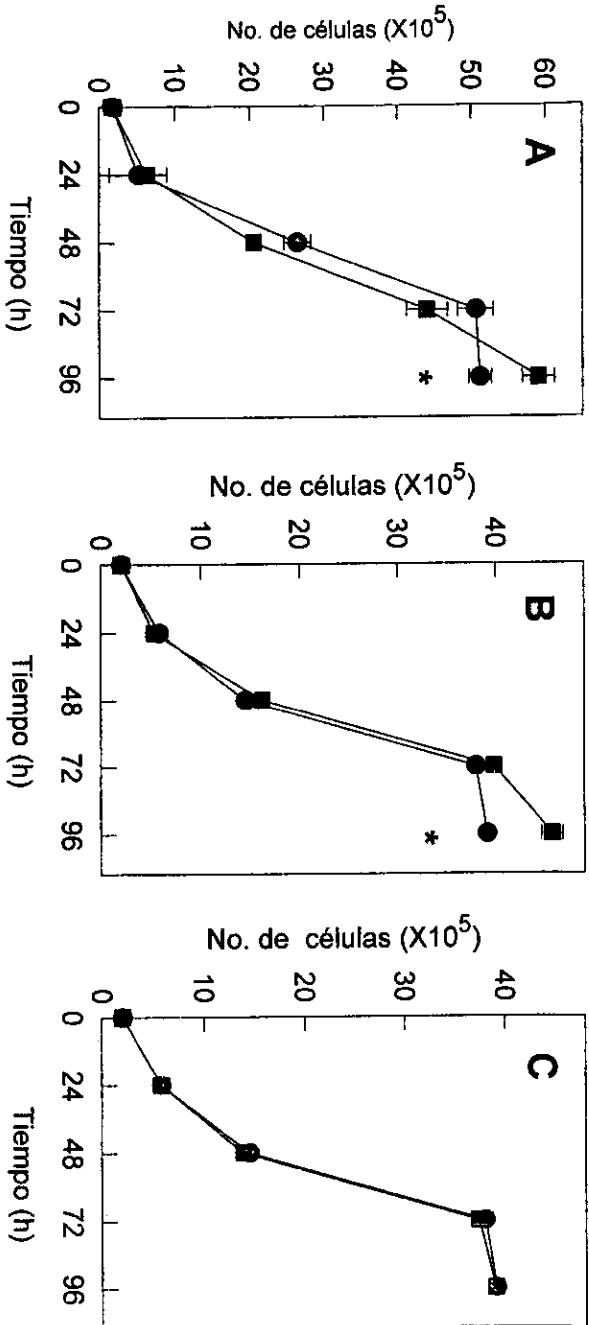


Figura. 1.- Efecto del isotretinoinol sobre el crecimiento de *Euglena gracilis*. Las células de *Euglena gracilis* se cultivaron en medio de glu-mal sin (●) o con isotretinoinol (■), a concentraciones de 10⁻⁶ M (panel A), 10⁻⁵ M (panel B) o 10⁻⁴ M (panel C). Los valores representan la X ± ES de 5 experimentos realizados por duplicado. * p < 0.005.

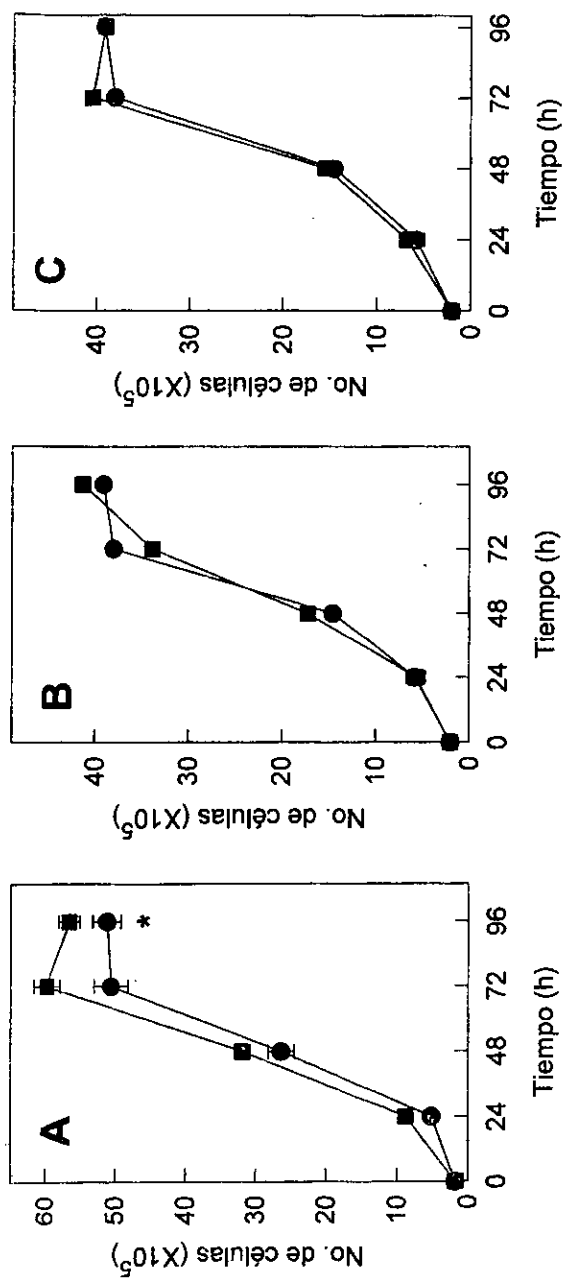


Figura 2.- Efecto de epinefrina sobre el crecimiento de *Euglena gracilis*.

Las células de *Euglena gracilis* se cultivaron en medio de glu-mal, sin (●) o con epinefrina (■), a concentraciones de 10⁻⁶ M (panel A), 10⁻⁵ M (panel B) o 10⁻⁴ M (panel C). Los valores representan la X ± ES de 5 experimentos realizados por duplicado. p < 0.01.

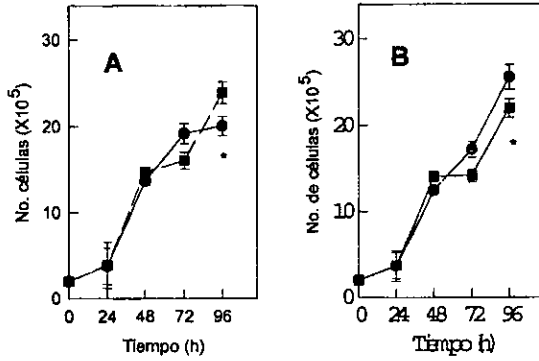


Figura 3. Efecto del isoproterenol sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* cultivadas en medio de lactato y etanol.

Las células de *Euglena gracilis* se cultivaron en medio de lactato (panel A) ó etanol (panel B), grupo control (●) ó en presencia de isoproterenol 1 μM (■). Los valores representan la X ± ES de 4 experimentos realizados por duplicado. *p < 0.01

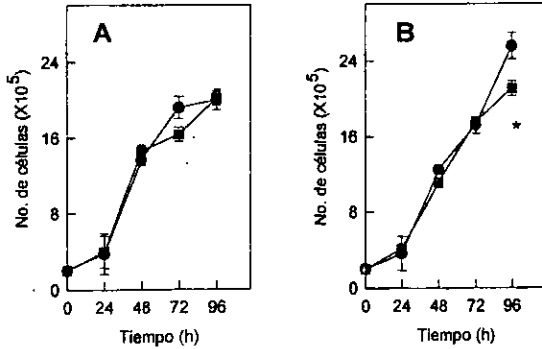


Figura 4. Efecto de la epinefrina sobre el crecimiento de *Euglena gracilis* cultivadas en medio de lactato y etanol.

Las células de *Euglena gracilis* se cultivaron en medio de lactato (panel A) o etanol (panel B), grupo control (●) o en presencia de epinefrina 1 μM (■). Los valores representan la X ± ES de 5 experimentos realizados por duplicado. * p < 0.01

similar al control. Cuando las células son crecidas en etanol (figura 5 B), presentan una disminución de la población a las 96 h similar al observado en células crecidas en etanol cuando se estimulan con isoproterenol 1 μM .

Dado que el efecto de los agonistas isoproterenol o epinefrina sobre el comportamiento del crecimiento poblacional se observó principalmente a las 96 h en el medio de glu-mal, se elaboró una gráfica de la comparación del efecto de los agonistas sobre la densidad poblacional a este tiempo. Cuando el estímulo es dado por isoproterenol 1 ó 10 μM la densidad poblacional se incrementa 15 y 10% respectivamente (figura 5). Cuando el estímulo es dado por epinefrina 1 μM la densidad de la población se incrementa 10% (figura 6). Este patrón de estimulación en el incremento de la densidad de la población a las 96 h, se observa con ambos estímulos adrenérgicos, pero la mayor respuesta con isoproterenol puede deberse a que posiblemente en esta participa un receptor de tipo β -adrenérgico, ya que el isoproterenol es un agonista específico para este receptor.

La respuesta que se obtuvo con los agonistas adrenérgicos en las células cultivadas en los diferentes medios fue diferente a las 96 h, por lo que se comparó la producción de AMPc de éstas células, en fase estacionaria. Con este fin, se realizaron curvas de dosis respuesta (CDR) a los agonistas adrenérgicos. La respuesta se midió como el cambio en la concentración de AMPc durante 2 minutos. En la figura 7 se observa la CDR a isoproterenol en células provenientes de los diferentes medios: glu-mal ó lactato ó etanol. Cuando las células cultivadas en glu-mal se estimularon con isoproterenol (figura 7 A) se observó un incremento pequeño (no significativo) de AMPc a la concentración de 10 nM y este aumento permanece constante para las diferentes concentraciones utilizadas. En células cultivadas en lactato no hay un incremento de AMPc por el estímulo con isoproterenol (figura 7 B). En células crecidas en etanol al dar el estímulo con isoproterenol se observa que la estimulación es dependiente de la concentración, entre 10 nM y 1 μM (significativa solo para 100 nM y 1 μM), pero a altas concentraciones 1-10 μM se observa una disminución de la respuesta por lo cual

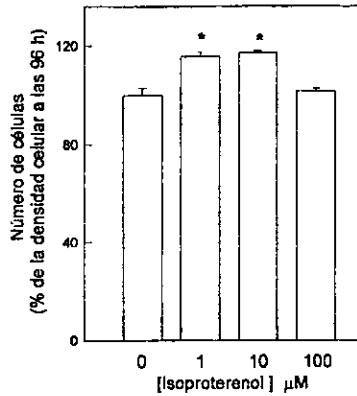


Figura 5.- Efecto del isoproterenol sobre la densidad celular en cultivos de *Euglena gracilis* en fase estacionaria.

Las células de *Euglena gracilis* se cultivaron durante 96 horas en medio de glu-mal, sin (0) o con isoproterenol a las concentraciones indicadas. Los barras representan la $X \pm \text{ES}$ de 2 a 5 preparaciones por duplicado ($n= 4$ a 10). Los valores se presentan como porcentaje de la densidad celular obtenida a las 96 horas, que fue de 5.1×10^6 células. * $p < 0.001$

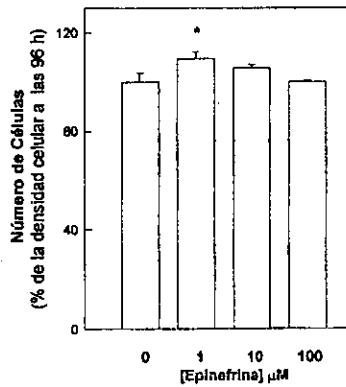


Figura 6.- Efecto de la epinefrina sobre la densidad celular en cultivos de *Euglena gracilis* en fase estacionaria.

Las células de *Euglena gracilis* fueron cultivadas durante 96 horas en glu-mal, sin (0) o en presencia de epinefrina a las concentraciones indicadas. Los barras representan la $X \pm \text{ES}$ de 2 a 5 preparaciones por duplicado ($n= 4$ a 10). Los valores se presentan como porcentaje de la densidad celular obtenida a las 96 horas, que fue de 5.1×10^6 . * $p < 0.05$

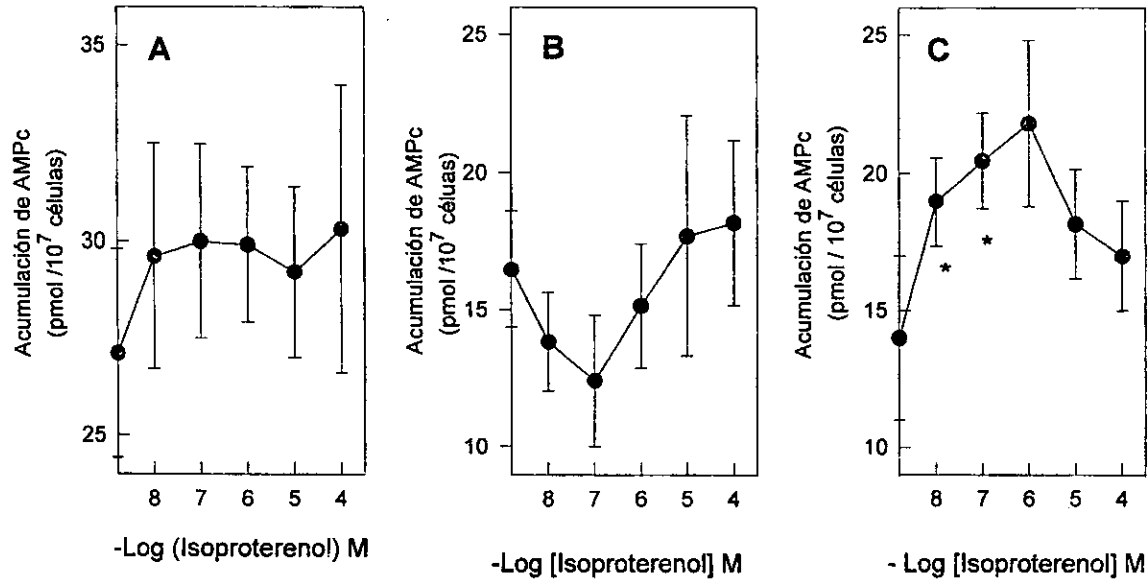


Figura 7.- Efecto de isoproterenol sobre la acumulación de AMPc en células de *Euglena gracilis*.

Las células de *Euglena* se cultivaron en los medios de glu-mal (panel A), lactato (panel B) o etanol (panel C); en fase estacionaria se cosecharon y lavaron, como se describe en métodos y se incubaron con isoproterenol a las concentraciones indicadas en la figura, el incremento de AMPc fue determinado por radioinmunoensayo. Los valores representan la $\bar{X} \pm ES$ de 7 experimentos realizados por duplicado. * $p < 0.05$

podríamos pensar que a estas concentraciones las células podrían sufrir de una desensibilización de la respuesta (Figura 7 C).

Cuando el estímulo adrenérgico es dado por epinefrina, se observa en la CDR de las células cultivadas en glu-mal que a concentraciones de 10 a 100 μM se presenta una producción de AMPc dependiente de la concentración, y que ésta estimulación es aproximadamente del 40% sobre el basal a la dosis máxima, (Figura 8 A), no obstante, sólo se trata de tendencias pues debido a la dispersión de los datos, las diferencias no son significativas. Cuando la epinefrina se añade en las células cultivadas en etanol solo se observa un incremento en los niveles de AMPc a la concentración de 100 μM del agonista, (Figura 8 C), que tampoco resultó significativo. En células crecidas en lactato el estímulo dado por epinefrina no presenta ningún efecto sobre la acumulación de AMPc, (Figura 8 B). El isoproterenol ejerce una estimulación pequeña, sobre la respuesta del segundo mensajero en células de *Euglena gracilis* en comparación con la que puede inducir este agonista en células de mamífero.

Los resultados obtenidos sugieren, que si *Euglena gracilis* presenta un receptor tipo β -adrenérgico, éste podría ser un receptor atípico, presente en pequeñas cantidades, o ser un receptor que presente un acoplamiento muy débil entre los elementos de transducción de la señal.

Para ver, si la limitada respuesta adrenérgica se debe a la cantidad de receptor, se realizaron ensayos de unión a ligando para conocer el número y la afinidad de dichos receptores en *Euglena gracilis*, crecidas en medio de glu-mal. La curva de saturación con el antagonista β -adrenérgico [125]iodocianopindolol ($[(^{125}\text{I})\text{ICYP}]$) se muestra en la figura 9. En esta se observa que existe una unión específica con el antagonista que es saturable. Al realizar un análisis de Scatchard (inserto en la Figura 9) se calcula que el número de receptores es de 4.19 fmol/mg de proteína de membrana y que la K_d es de 73.9 pM, valor que se encuentra dentro del rango reportado para receptores β -adrenérgicos. Dado que nuestro receptor está presente en pequeñas cantidades no se pudo profundizar en la caracterización farmacológica.

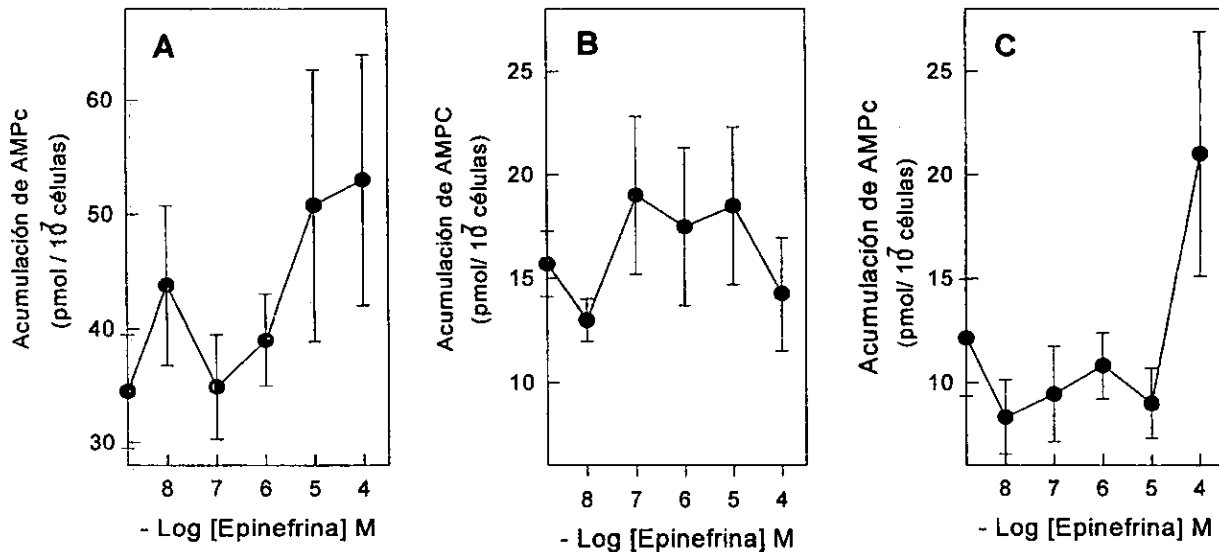


Figura 8.- Efecto de la epinefrina sobre la acumulación de AMPc en células de *Euglena gracilis*. Las células de *E. gracilis* se cultivaron en los medios de glu-mal (panel A), lactato (panel B) y etanol (panel C); en fase estacionaria se cosecharon y lavaron como se describe en métodos y se incubaron con epinefrina a las concentraciones indicadas en la figura. El AMPc fue determinado por radioinmunoensayos. Los valores representan la $X \pm ES$ de 7 experimentos realizados por duplicado.

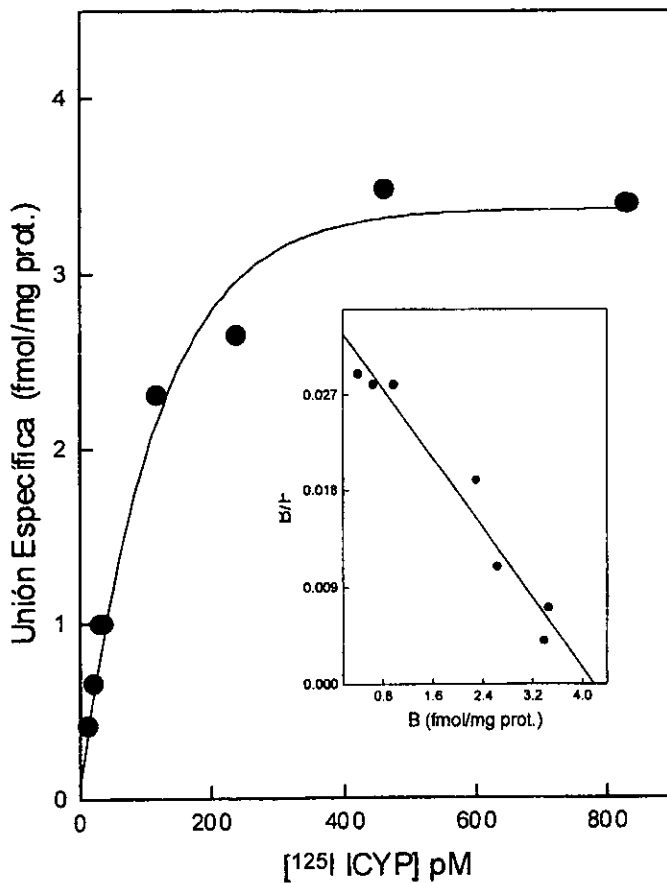


Figura 9.- Ensayo de unión con el radioligando $[^{125}\text{I}]\text{ICYP}$ en membranas de *E. gracilis* provenientes del medio de glu-mal. El inserto corresponde al gráfico de Scatchard realizado a partir de los datos obtenidos en la saturación. La gráfica es representativa de 3 ensayos realizados por triplicado

El acoplamiento de la señal generada por un receptor β -adrenérgico con la adenilato ciclasa es mediado por una proteína G_s , éste sistema es bien conocido en células de mamífero. Esta proteína acopla la señal recibida por el receptor y la transmite a la adenilato ciclasa. Trabajos en el laboratorio sugieren la presencia de una proteína G_s en *Euglena gracilis* (Torres-Márquez y col., 1994). Para saber si esta potencial proteína G_s está acoplada a la adenilato ciclasa en *Euglena gracilis*, se midió la actividad de la adenilato ciclasa en ausencia o en presencia de $GTP\gamma S$ y $GMpNHpp$, análogos del GTP no hidrolizables. En la figura 10, se muestra que tanto $GTP\gamma S$ como el $GMpNHpp$ estimulan la actividad de la adenilato ciclasa de manera dependiente de la concentración. La respuesta fue mayor con $GTP\gamma S$ que con $GMpNHpp$, 50% vs 20% respectivamente a la concentración máxima. Estos datos nos sugieren que la proteína G_{α_s} , presente en *Euglena gracilis*, esta acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa.

Otra forma de ver el acoplamiento de la adenilato ciclasa con la proteína G_s consiste en activar a la proteína G_s con toxina del cólera. Esta toxina permite la disociación de la proteína $G_{\alpha s}$ del complejo $\beta\gamma$ y la activación permanente de la adenilato ciclasa. Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que en las células de *Euglena* incubadas en medio de glu-mal con toxina del cólera por 2 h, se indujo un incremento en la producción de AMPc del 76% sobre el basal o control (la Tabla II). Al obtener membranas de las células crecidas bajo las mismas condiciones, se encontró que la actividad de la adenilato ciclasa se incrementó tres veces sobre la basal. Estos datos sugieren que la proteína de tipo G_s en *Euglena gracilis* está acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa.

El polisacárido de reserva en células animales es el glucógeno, éste polisacárido es utilizado cuando las células se encuentran en condiciones de ayuno, el balance entre la síntesis y la degradación del glucógeno es mediado por regulación alostérica (Ca^{2+}) y covalente (AMPc-PKA) de la glucógeno fosforilasa. *Euglena gracilis* acumula paramilo, un polisacárido de reserva energética (glucosa; enlaces β 1,3). La síntesis y degradación del paramilo en *Euglena gracilis* no son procesos del todo conocidos. Por otra parte, *Euglena* es capaz de generar AMPc

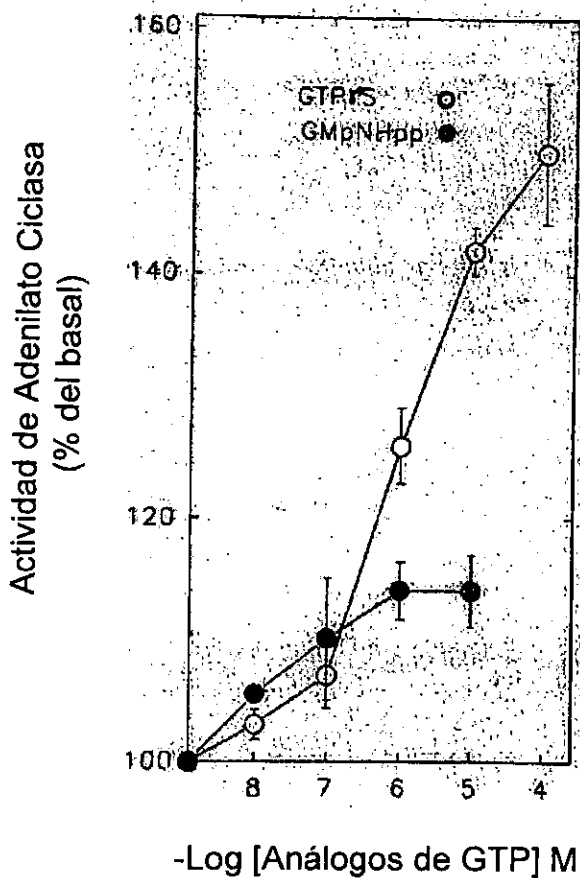


Figura 10.- Estimulación de la adenilato ciclasa por análogos de GTP en membranas de *E. gracilis*.

La actividad de la adenilato ciclasa se ensayó por 10 min en presencia de las diferentes concentraciones de los análogos de GTP. Los valores son expresados como el porcentaje de la actividad basal, la cual fue de 237 ± 27 pmol/min/mg prot.

	BASAL (pmol/10 ⁷ células)	PREINCUBACION CON TOXINA DEL COLERA (pmol/min/mg proteína)
AMPc	6.77 ± 0.78	11.9 ± 1.2
Actividad de la adenilato ciclasa	14.58 ± 2.7	54.48 ± 5.1

Tabla II.- Efecto de toxina del cólera sobre la acumulación del AMPc en células y la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de *Euglena gracilis*. Las células cultivadas en medio de glu-mal, se incubaron en amortiguador de fosfatos 10 mM a pH 7, en ausencia (control) ó presencia de toxina del cólera (100 µM) durante 2 h, después las células se utilizaron para medir AMPc o para obtener membranas y medir la actividad de la adenilato ciclasa como se describe en la sección de métodos. Los datos representan la X ± ES de 5 experimentos realizados por triplicado.

intracelular por lo que nos preguntamos si el AMPc podría regular el metabolismo del paramilo de manera semejante al metabolismo del glucógeno en células animales. La concentración de AMPc depende de su síntesis y su degradación, proceso último realizado por las fosfodiesterasas del AMPc. Por lo tanto, transferimos células que estaban creciendo en medio de glu-mal en fase estacionaria al medio salino que sirve de base para los cultivos, pero en ausencia de cualquier fuente de carbono. A éstos cultivos se les adicionó inhibidores de fosfodiesterasas del AMPc; teofilina (10 mM) o cafeína (1 mM).

En la figura 11 A, se observa como se presenta una degradación del 36% del paramilo después de 48 h. Cuando se adicionaron los inhibidores de la fosfodiesterasa, para evitar la degradación de AMPc, se observó; que en presencia de teofilina (Figura 11 B) hay incremento en la síntesis del paramilo a las 24 h y degradación a las 48 h. Esta síntesis y degradación del paramilo mostró un patrón cíclico, con niveles por arriba del basal de las células control. Las células expuestas a cafeína, (Figura 11 C) mantienen el nivel de paramilo prácticamente constante.

Debido a que ambos inhibidores de fosfodiesterasas utilizados presentan un patrón diferente, no podemos comparar la regulación de la síntesis y degradación del paramilo en células de *Euglena gracilis* con el metabolismo del glucógeno en células animales.

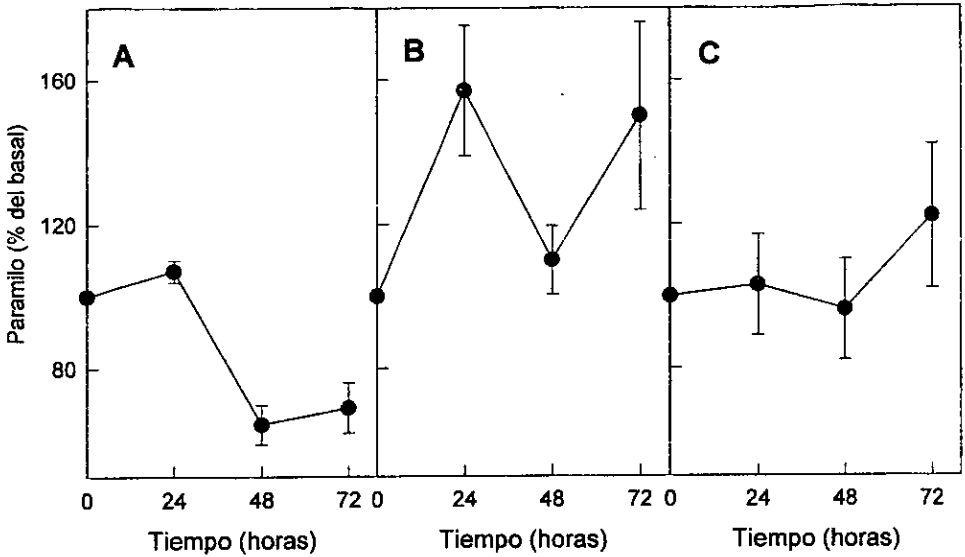


Figura 11. Degradación de paramilo en células de *Euglena gracilis*. Las células provenientes del medio de glu-mal en fase estacionaria, se pasaron a un medio sin fuente de carbono y se incubaron en ausencia (panel A) o en presencia de teofilina 10 mM (panel B) o cafeína 1 mM (panel C). Se tomaron muestras a los tiempos de incubación indicados y se les midió la cantidad de paramilo.

Vale la pena mencionar, que la acumulación de paramilo depende de la fuente de carbono que utilice la célula. La concentración de paramilo en las células provenientes de glu-mal, lactato y etanol en fase estacionaria es de 70, 200 y 600 μg de glucosa / 10^6 células respectivamente.

Otra estrategia que se siguió para saber si el receptor β -adrenérgico presente en *Euglena gracilis* funciona de manera similar al de células de mamíferos, en la regulación del metabolismo del glucógeno, fue la de medir la actividad de paramilo fosforilasa. La enzima equivalente en mamífero es la glucógeno fosforilasa b y ésta es regulada por AMPc, tras la estimulación con isoproterenol. En la figura 12 se observa que al incrementar la concentración de

isoproterenol, la enzima paramilo fosforilasa se estimula ligeramente (12%) aunque no de manera significativa. Desafortunadamente, no sabemos si esto se debe a que el incremento de AMPc generado por el estímulo no fue suficiente para activar a la paramilo fosforilasa o que la enzima no es regulada de manera semejante a la de los mamíferos, o que participan otros factores no evaluados. Por ejemplo, que el paramilo pudiera haber tenido contaminación con el SDS que se usa para lavarlo cuando se extrae de las células, éste se lavó extensivamente después de su extracción, sin embargo no sabríamos la sensibilidad de la enzima a éste detergente en caso de que hubiera algún residuo. No se usó paramilo comercial porque no sabemos de algún distribuidor que lo tenga disponible.

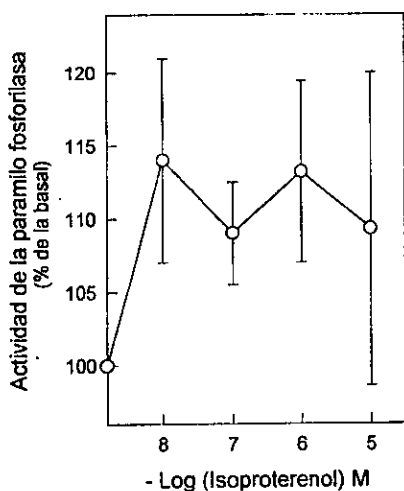


Figura 12. Actividad de la paramilo fosforilasa de *Euglena gracilis*. Las células provenientes de medio de glu-mal en fase estacionaria se incubaron por 10 min. con isoproterenol a las concentraciones indicadas, se lisaron y se les midió la actividad de paramilo fosforilasa como se describe en la sección de métodos. Los datos representan la $X \pm ES$ de 3 experimentos realizados por duplicado.

DISCUSIÓN

La regulación de la actividad bioquímica en respuesta a señales externas es un proceso extremadamente complejo, uno de los más estudiados es el mediado por los receptores acoplados a proteínas G. En tal caso la activación de un receptor de superficie celular por un ligando específico, conduce a la producción de segundos mensajeros de bajo peso molecular (AMPC, GMPc, IP₃, DG, etc.)

Los agonistas β -adrenérgicos, a través del AMPC, estimulan la proliferación celular en células paratiroideas de rata *in vivo* y en cultivo (Tsang y col., 1980). La regeneración del hígado de rata, timocitos, melanocitos y cultivos celulares (Whitfield y col., 1970; Pawlek y col., 1975;1983 ;1987; Nakamura y col., 1983) proveen también interesantes ejemplos de este mecanismo. En *Euglena gracilis* se han observado variaciones de AMPC en ritmos circadianos (Carré y col., 1989) los cuales coinciden con los picos en la síntesis de DNA (Carré y Edmunds, 1993). En este trabajo se estudió la respuesta de agonistas β -adrenérgicos (isoproterenol y epinefrina) en células de *E. gracilis*, en relación con la proliferación celular. El segundo mensajero (AMPC) generado por el isoproterenol o la epinefrina no participa en la proliferación celular, como se observa en las curvas de crecimiento de *E. gracilis*; sin embargo, estimula un incremento en la densidad poblacional a las 96 horas (fase estacionaria), principalmente cuando el estímulo es dado por isoproterenol. Es posible que en este punto, el incremento de AMPC generado por isoproterenol participe en una "prolongación" de la sobrevivencia celular.

Por otro lado, la baja respuesta de epinefrina en la proliferación celular de *E. gracilis* puede deberse posiblemente a que además de la estimulación de los receptores β -adrenérgicos, se estimulen los receptores α_2 -adrenérgicos, produciendo un efecto contrapuesto sobre los niveles de AMPC.

La estimulación de *E. gracilis*, provenientes de diferentes medios de cultivo (glu-mal, lactato y etanol) en fase estacionaria a tiempos cortos, por el agonista β -adrenérgico, dió resultados diferentes de acuerdo a medio en que se cultivaron. En células crecidas en glu-mal el nivel de AMPC se incrementó ligeramente y la estimulación se mantuvo constante a las diferentes concentraciones del agonista

(0.01 a 100 μM). En las células cultivadas con lactato como fuente de carbono no hubo incremento de AMPc por el agonista β -adrenérgico, mientras que en las células crecidas en etanol se observó respuesta estimuladora sólo a la concentración de 1 μM , no obstante al aumentar la concentración del isoproterenol se observó una disminución de los niveles de AMPc. Este último comportamiento podría ser debido a una desensibilización de la respuesta. Cuando el estímulo es dado por epinefrina, las células crecidas en glu-mal mostraron un incremento de AMPc con cierta dependencia de la dosis del agonista hasta un máximo del 40% sobre el basal que correspondió a la dosis máxima de agonista. La respuesta estimuladora de la producción de AMP en células crecidas en etanol, solo se presentó a la dosis máxima. Entonces, el estímulo generado por los agonistas adrenérgicos sobre la respuesta del segundo mensajero es muy pequeño, con relación al efecto que éstos agonistas tienen sobre células de mamífero.

Nuestros datos muestran solo tendencias en el incremento de la acumulación de AMPc estimulado por isoproterenol o epinefrina, ya que las desviaciones estándar de la media son muy grandes (observadas en las gráficas 8 y 9). *E. gracilis* desarrolla ritmos circadianos en células crecidas bajo ciclos de luz-obscuridad, la modificación en la duración del ciclo se desfasó por 2 h cuando se varió la periodicidad del ciclo luz-obscuridad (Carré y col., 1989). Desconocemos si en *E. gracilis* crecidas en obscuridad constante como lo hacemos en el laboratorio se mantenga este ciclo circadiano y/o si la periodicidad del mismo pudiera variar. Estos ritmos circadianos correlacionan con los niveles de AMPc y nuestras determinaciones no se hicieron en horarios constantes, por lo que creemos que esto podría representar una de las razones para que la estimulación no se observara de manera constante. Por ejemplo, si se estimulara una célula con una [AMPc] basal alta, podría no responder igual que una célula cuyos niveles del segundo mensajero en ese momento son bajos. Por otro lado, en la figura 13 se observa que la desviación estándar de la media en la curva patrón de determinación de AMPc, de 4 experimentos diferentes es muy pequeña (0.04 a 0.05); lo que nos permite descartar que las variaciones en la determinación del segundo mensajero se deban a problemas técnicos de la determinación *per se*.

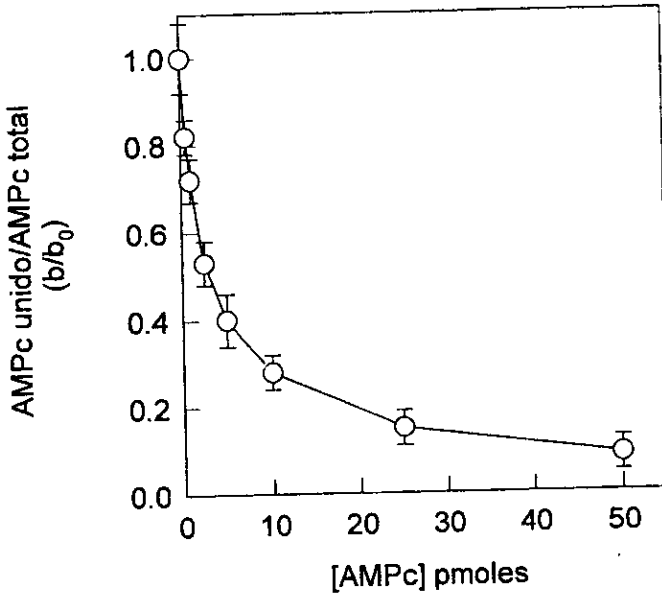


Figura 13. Curva patrón para la determinación de AMPc.

La relación b/b_0 expresa la cantidad de AMPc marcado que permanece unido al anticuerpo después de ir añadiendo las concentraciones indicadas de AMPc no marcado. La relación b/b_0 obtenida de nuestras muestras de *E. gracilis* se interpolaron en este tipo de curvas, elaboradas en cada uno de los experimentos para obtener las concentraciones del nucleótido correspondientes. Los valores representan la $X \pm ES$ de 4 experimentos por realizado duplicado.

Además de sugerir que la respuesta adrenérgica en células de *E. gracilis* depende de las condiciones de crecimiento, la estimulación de la producción de AMPc por catecolaminas, nos sugiere que el receptor tipo β -adrenérgico de este organismo pueda ser un receptor atípico, o que el receptor presente un acoplamiento muy débil entre los elementos de transducción de la respuesta.

Se ha detectado un receptor β -adrenérgico, en el protozooario parásito

flagelado *Trypanosoma cruzi* y en esta tesis encontramos por estudios de unión ligando [¹²⁵I]ICYP, también un receptor tipo β -adrenérgico en *E. gracilis*. El número de receptores presente en membrana de *E. gracilis* es de 4.1 fmol/mg de proteína y una Kd 73.9 pM. Esto indica que el receptor se encuentra en pequeñas cantidades en *Euglena*, si lo comparamos con los niveles de receptores presentes en algunos tipos de células animales. Por ejemplo, en células de hepatoma AH130 y hepatocitos de rata el número de receptores es de 1928 o 69.9 fmol/mg de proteína respectivamente (Sanae y col., 1989; García-Sáinz y col., 1989), en las células de corazón de hámster es de 37 fmol/mg de proteína (St-Onge, 1993) y en hígado de perro es de 67 fmol/mg prot. (García-Sainz y col., 1996). Cuando se compara el número de receptores presentes en un organismo filogenéticamente más cercano, *T. cruzi*, observamos que aún en éste organismo existe un número mayor de receptores comparado con el de *E. gracilis*, 348 vs 4.1 fmol/mg prot respectivamente.

En este contexto se obtuvieron evidencias de que, la transducción de la señal β -adrenérgica se manifiesta en un protozoario de vida libre como *E. gracilis* y por tanto que el sistema de transducción de señales aparece antes de la divergencia de los parásitos y de los organismo flagelados de vida libre.

Elementos del mecanismo de transducción del receptor β -adrenérgico que participan cascada debajo de la proteína G, como son: la enzima que sintetiza AMPc o la adenilato ciclasa (Keirns y col., 1973; Torres-Márquez y col., 1994; Vega y col., 1996), la proteína aceptora de éste o PKA (Carré y col., 1992), están presentes en *Euglena gracilis*. Los receptores que activan de manera estimulatoria a la adenilato ciclasa, lo hacen por medio de una proteína G_s (Spiegel y col., 1992). En el laboratorio se había demostrado previamente la presencia de una proteína tipo G α_s en *E. gracilis*, con un PM aproximado de 42 kDa, sustrato para toxina del cólera y reconocida por un anticuerpo dirigido contra el decapeptido carboxilo terminal de la subunidad G α_s (Torres-Márquez y col., 1994). En éste trabajo, se demostró que esta proteína está acoplada con la adenilato ciclasa, mediante la activación de ésta última con análogos de GTP. Además se encontró que en membranas de células pre-incubadas con toxina del cólera se induce la

activación de ésta enzima, al mismo tiempo que en células intactas se incrementan los niveles AMPc. Estos resultados nos indican la existencia de una proteína G_s acoplada a la adenilato ciclasa en *E. gracilis*, que a su vez pueda estar asociada con el sistema de transducción acoplado al receptor de tipo β-adrenérgico. La proteína G acoplada con la adenilato ciclasa en *E. gracilis*, otro de los elementos del sistema de transducción que aparece en organismos ancestrales del phylum Protozoa, antes de la divergencia de los parásitos.

Se pretendió también en este trabajo, explorar si el AMPc generado en *Euglena* cumpliera una de las funciones que tiene en las células de mamífero, como es la regulación del metabolismo del glucógeno. El glucógeno es el polisacárido de reserva de células animales, el balance entre la síntesis y degradación de glucógeno es mediada por regulación alostérica y/o covalente de la glucógeno fosforilasa. Esta respuesta es modulada de manera alostérica por Ca²⁺ y por regulación covalente, ya que es fosforilada por la PKA. En *E. gracilis* el polisacárido de reserva es el paramilo. Los experimentos realizados con teofilina y cafeína, que son inhibidores de las diferentes familias de fosfodiesterasas caracterizadas hasta ahora (Beavo, 1995), tuvieron el fin de evitar la degradación de AMPc y así incrementar sus niveles; esto nos permitiría estimular a la paramilo fosforilasa por medio de la fosforilación mediada por PKA. Al utilizar los inhibidores de fosfodiesterasas se observó un comportamiento diferente para cada uno de ellos en la degradación del paramilo: mientras que la teofilina incrementó los niveles de paramilo, la cafeína no los modificó. En éste sentido, se ha reportado que si bien la teofilina y/o la cafeína pueden inhibir a las diferentes isoformas de fosfodiesterasas, la K_i para cada una de ellas puede variar (Howell, 1993; Beavo, 1995), y desconocemos que isoformas de fosfodiesterasas estén presentes en *Euglena gracilis*. Otra variable que no podemos descartar es que la permeabilidad de la teofilina y la cafeína sean diferentes. En un futuro estos experimentos podrían ir acompañados con la medición de los niveles intracelulares de [AMPc] para corroborar que éstos compuestos están ingresando a la célula e induciendo los efectos sobre el nucleótido cíclico.

In vivo varias hormonas promueven la activación de la glucógeno fosforilasa

por medio de la fosforilación de la enzima. Uno de los mecanismos de transducción involucrados en la activación de la glucógeno fosforilasa es el mediado por la estimulación del receptor β -adrenérgico. En este trabajo al estimular *in vivo* a la paramilo fosforilasa con isoproterenol (agonista β -adrenérgico) se observó una pequeña estimulación del 12% de la actividad; sin embargo, esta es una respuesta muy pequeña en relación con la observada en células de mamíferos. El que nuestros resultados solo muestren una tendencia en la activación de la paramilo fosforilasa puede ser debido a que el número de receptores β -adrenérgicos presentes en *Euglena gracilis* es pequeño y o pobremente acoplado al sistema transductor.

CONCLUSION

Euglena gracilis presenta elementos de un sistema de transducción de señales que involucra la producción de AMPc. Un pequeño número de receptores tipo β -adrenérgico, una adenilato ciclasa y una proteína G_s acoplada de manera estimuladora a la adenilato ciclasa. La producción de AMPc estimulada por el receptor no parece estar acoplada a la síntesis de paramiio, ni a la proliferación celular, por lo que el significado fisiológico de esta vía aún esta por determinarse.

BIBLIOGRAFIA

- Beavo, J.A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75: 725-48.
- Böhn, S.K.; Grady, E.F. and Bunnett, N.W. (1997) Regulatory mechanism that modulate signalling by G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 322: 1-8
- Buetow, D.E. (1968) *The Biology of Euglena*. Ed. Academic Press, INC. Vol I pp 22-95
- Carré, I.A. and Edmunds, L.N. Jr. (1992) cAMP-dependent kinases in the algal flagellate *Euglena gracilis*. *J. Biol. Chem.* 267: 2135-2137.
- Carré, I.A. and Edmunds, L.N. (1993) Oscillator control of cell division in *Euglena*: cyclic AMP oscillations mediate the plasing of the cell division cycle by the circadian clock. *J. of Cell Science* 104: 1163-1173.
- Carré, I.A.; Lava-Martin, D.L. and Edmunds, L.N. (1989) Circadian changes in cyclic AMP levels in synchronously dividing and stationary-phase cultures of the achlorophyllous ZC mutant of *Euglena gracilis*. *J. of Cell Science* 94: 267-272.
- Clapham, D.E. (1996) The G-protein nanomachine. *Nature* 379: 297-299.
- De Castro, S.L. and Olivera, M.M. (1987) Radioligan binding characterization of beta-adrenergic receptors in the protozoa *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C: 5-8.
- Dixon, R.A.F. (1987) Structural features required for ligand binding to the β -adrenergic receptor. *Embol. J.* 6: 3269-3275.
- Fields, T.A. and Casey, P.J. (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem. J.* 321: 561-571.
- García-Sáinz, J.A.; Alcántara, R.; Hernández-Sotomayor, S.M. and Mas-Oliva, J. (1989) Beta adrenoceptors in rat hepatoma. Desensitization by isoproterenol and phorbol-myristate-acetate. *Life Sci.* 44: 1767-75
- García-Sáinz, J.A.; Cruz-Muñoz, M.E. and Romero-Avila, T. (1996) Characterization of the β_2 -adrenoceptors of dog liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 115C: 61-65.
- Gilman, A.F. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Higashijima, T; Uzu, S; Nakajima, T. and Ross, E.M. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263: 6491-6494.
- Higashijima, T; Burnier, J. and Ross, E.M. (1990) Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* 265: 14176-14186.
- Howell, L.L. (1993) Comparative effects of caffeine and selective phosphodiesterase inhibitors on respiration and behavior in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 894-903.
- Huff, R.M. and Neer, E.J. (1986) Subunit interactions of native and ADP-ribosylated α_{39} and α_{41} , two guanine nucleotide-binding proteins from bovine cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 261: 1105 -1110.
- Ibarra Barajas M (2000) Caracterización de los subtipos de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos en arterias de ratas normotensas y espontáneamente hipertensas. Tesis de Doctorado. CINVESTAV IPN. pp. 6, 82-83
- Janakidevi, K; Dewey, V.C. and Kidder, G.W. (1966) The biosynthesis of catecholamines in two genera of protozoa. *J. Biol. Chem.* 241: 2576-2578.
- Keims, J. J; Carritt, B; Freeman, J; Eisenstadt, J.M. and Bitensky, M.W. (1973) A denosine 3',5' cyclic monophosphate in *Euglena gracilis*. *Life Sciences* 13: 287-302
- Krupnick, J.G. and Benovic, J. L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
- Lefkowitz, R.J. (1998) G-protein coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 273:18677-18680.
- Lenhinger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. (1993) Principles of Biochemistry 2a. ed. Ed Worth in EUA. pp 235-242.
- Lomasney, J.W; Allen, L.F. and Lefkowitz, R.J. (1995) Cloning and regulation of catecholamine receptor genes. *Mol. Endocrinology: Basic concepts and clinical correlations.* Ed. B. D. Weintraub. Raven Press. Ltd., New York. pp 115-131.
- Lowry, O; Roserbrough, N.; Farr, A. and Ryall,R. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Matsumoto, K., Uno, I. and Ishikawa, T. (1985) Isolation and characterization of a phosphoprotein phosphatase-deficient mutant in yeast. *Yeast* 15-24.

- Moreno-Sánchez, R. and Raya, J.C. (1987) Preparation of coupled mitochondria from *Euglena* by sonication. *Plant Sci.* 48: 151-157.
- Nakamura, T; Tomonura, A; Nodaj, C; Shimoji, M. and Ichihara, A. (1983) Acquisition of a β -adrenergic response by adult rat hepatocytes during primary culture. *J. Biol. Chem.* 258: 9283-9289.
- Nakano, Y; Urade, Y; Urade, R. and Kitaoka, S. (1987) Isolation, purification, and characterization of the pellicle of *Euglena gracilis* z. *J. Biochem.* 102: 1053-1063.
- Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane. Signals. *Cell* 80: 249-257.
- Pawelek, J., Halaban, R., Christie, G. (1975) Melanoma cells wich require cyclic AMP for growth. *Nature* 258: 539-540.
- Pawelek, J.M. (1979) Evidence suggesting that a cyclic AMP-dependent protein kinase is a positive regulator of proliferation in Cloudman S91 melanoma cells. *J Cell Physiol.* 98: 619-25.
- Pawelek, J., Emanuel, J., Kahn, R., Murray, M. and Fleischmann, R. (1983) Interactions between insulin and the cyclic AMP system of Cloudman S91 mouse melanoma cells. *J Cell Biochem.* 21: 289-97.
- Probst, W.C; Snyder, L.A; Schuster, D.I; Brosius, J. and Sealfon, S.C. (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA and Cell Biology* 11: 1-20.
- Rubenstein, R.C; Wong, S.K.F. and Ross, E.M. (1987) The hydrophobic tryptic core of the β -adrenergic receptor retains Gs regulatory activity in response to agonists and thiols. *J. Biol. Chem.* 262: 16655-16662.
- Salomon, Y., Londos, C. and Rodbell, M. (1974) A highly sensitive adenylyate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-546.
- Sanae, F., Miyamoto, K. and Koshiura, R. (1989) Altered adrenergic response and specificity of the receptors in rat ascites hepatoma AH130. *Cancer Research* 49: 6242-6246.
- Savarese, T.M. and Fraser, C.M. (1992) *In vitro* mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 283: 1-9.
- Spiegel, A.M; Shenker, A. and Weinstein, L.S. (1992) Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Reviews* 13: 536-564.

- Spiegel, A.M; Shenker, A; Simonds, F.W. and Weinstein, L.S. (1995) G protein dysfunction in disease. *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*, ed. B.W. Raven Press. Ltd., New York. pp 297-318
- St-Onge, S; Chidiac, P; Brakier-Gingras, L. and Bouvier, M. (1994) β -adrenergic receptor desensitization in the early stage of hereditary cardiomyopathy in hamsters. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72: 875-883.
- Strader, C.D., Sigal, I.S. and Dixon, R.A.F. (1989) Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J.* 3: 1825-1832.
- Strosberg, A.D. (1993) Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science* 2: 1198-1209.
- Tang, W.J. and Gilman, A.F. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell* 70:869-872.
- Taussig, R. and Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound Adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270: 1-4.
- Torres-Márquez, M.E; Macias-Silva, M. and Vega-Segura, A. (1994) Gs protein in *Euglena gracilis*. *EBEC Short Reports* 8:11
- Tsang, B.K.; Rixon, R.H. and Whitfield, J.F. (1980) A possible role for cyclic AMP in the initiation of DNA synthesis by isoproterenol-activated rat thyroid gland cell. *J. Cell Physiol.* 102: 19-26.
- Uribe, A. (1992) Oxidación de sustratos y fosforilación oxidativa en mitocondrias de *Euglena gracilis*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Vega-Segura, M.A. y Torres-Marquez, M.E. (1996) Caracterización de la Adenilato Ciclasa de *Euglena gracilis*. XXI Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Manzanillo, Mex.
- Whitfield, J.F; MacManus, J.P. y Gillan, D.J. (1970) The possible mediation by cyclic AMP of the stimulation of the thymocyte proliferation by vasopressin and the inhibition of this mitogenic action by thyrocalcitonin. *J. Cell Physiol.* 76: 65-76.
- Wolken, J.L. (1967) *Euglena*. Appleto Century Crofts. USA. pp.1-204
- Wong, S.K.F; Slaughter, C; Ruoho, A.E. and Ross, E.M. (1988) The catecholamine binding site of the beta-adrenergic receptor is formed by juxtaposed membrane-spanning domains. *J. Biol. Chem.* 263: 7925-7928.
- Yokota, A; Hosoteni, K. and Kitaokas, (1982) Mechanism of metabolic regulation in photoassimilation of propionate in *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 213:530-537.