



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
INSTITUTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G α O HETEROTRIMÉRICAS
SENSIBLES A MASTOPARÁN QUE INHIBEN A LAS
GUANILILCICLASAS PARTICULADAS B Y SOLUBLE EN EL
MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINOS**

Tesis Doctoral que se presenta para optar al título de
Doctor en Ciencias Fisiológicas

Walid Hassan Soto

Caracas, Marzo de 2021



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
INSTITUTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G α O HETEROTRIMÉRICAS
SENSIBLES A MASTOPARÁN QUE INHIBEN A LAS
GUANILILCICLASAS PARTICULADAS B Y SOLUBLE EN EL
MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINOS**

Tesis Doctoral que se presenta para optar al título de
Doctor en Ciencias Fisiológicas

Walid Hassan Soto

Tutor : Ernesto Trejo

Co Tutora : Ítala Lippo de Bécemberg

ÍNDICE		
	Resumen	1
I	Introducción	3
1.1	Importancia de los Receptores Muscarínicos en el MLVA	5
1.2	Distribución de los Receptores Muscarínicos en las vías aéreas respiratorias	8
1.3	Disfuncionalidad del m2AChR	10
1.4	Mecanismos Moleculares de Activación de los receptores muscarínicos vinculados con la activación de las proteínas G heterotriméricas	17
1.5	Las Proteínas G Heterotriméricas: Estructura y Función	19
1.6	GMPc y la señalización celular	28
II	Objetivos	45
2.1	Objetivo General	45
2.2	Objetivos Específicos	45
III	Materiales y Métodos	46
3.1	Material biológico	46
3.2	Reactivos	46
3.3	Disección del MLTB	49
3.4	Actividad contráctil del MLTB	49
3.5	Tratamiento del tejido muscular para la extracción de los nucleótidos	51
3.6	Fraccionamiento subcelular del MLTB	54
3.7	La alquilación de M ₃ AChR con la mostaza 4-Difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP)	55
3.8	Determinación de la actividad de la Guanililciclase	56
3.9	Evaluación la actividad de NPR-B GC activada con CNP y de la sGC activada por SNP en presencia de péptidos C-terminal de las proteínas Gi/o	56
3.10	Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC alquiladas, activadas con carbamilcolina o Mastoparén, en presencia de anticuerpos anti- α Gi/o	58
3.11	Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC incubadas con anticuerpos anti-m3AChR, activadas con carbamilcolina o Mastoparén, en presencia de anticuerpos anti- α Gi/o	59
3.12	Método Estadístico	60

IV	Resultados	61
4.1	Efecto del Mastoparén sobre las señales de GMPc inducidas por carbamilcolina en el MLTB	61
4.2	Efecto de la PTX sobre las señales de GMPc inducidas por la acción con carbamilcolina en MLTB	61
4.3	Efecto de la PTX sobre las señales de GMPc en MLTB pre-incubado con Mastoparén y activado con carbamilcolina	63
4.4	Efecto de la PTX la activación de las sGC y NPR-GC-B con sus respectivos ligandos en presencia de Mastoparén	65
4.5	Efecto de la PTX sobre la actividad contráctil inducida con carbamilcolina MLTB	68
4.6	Evaluación la actividad de NPR-B GC activada con CNP y de la sGC activada por SNP en presencia de péptidos C-terminal de las proteínas Gi/o	71
4.7	Evaluación de la actividad GC inducida con carbamilcolina 10^4 M en membranas P1+P2 y P1+P2 20''CC bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR o alquiladas con mostaza 4-DAMP	71
4.8	Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B en fracciones de membranas P1+P2 que fueron alquiladas con mostaza 4-DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y posteriormente activadas con carbamilcolina y CNP-53, en presencia de anticuerpos anti- β o - α Gi/o	75
4.9	Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B en fracciones de membranas P1+P2 que fueron alquiladas con mostaza 4 DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y posteriormente activadas con Mastoparén y CNP-53, en presencia de anticuerpos anti- β o - α Gi/o	78
4.10	Evaluación de la actividad de la sGC en fracciones de membranas P1+P2 20''CC que fueron alquiladas con mostaza 4-DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y activadas con carbamilcolina y SNP, en presencia de anticuerpos anti- β o - α Gi/o	85
4.11	Evaluación de la actividad de sGC en membranas P1+P2 20''CC alquiladas con mostaza 4-DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR, activadas con Mastoparén y SNP en presencia de anticuerpos anti- α Gi/o	86

V	Discusión	95
5.1	Relación entre la producción de GMPc y la actividad contráctil del MLTB	96
5.2	Efecto de Mastoparén a concentraciones crecientes sobre las señales de GMPc	98
5.3	Posibles conformaciones heterotriméricas asociadas al m2AChR.	104
5.4	El Mastoparén, como activador directo de las proteínas Gi/o asociadas a la activación de la NPR-GC-B y la sGC	107
5.5	El efecto de Mastoparén como mecanismo novedoso capaz de sortear la disfuncionalidad del receptor m2AChR.	109
VI	Conclusiones	110
VII	Agradecimientos	111
VIII	Bibliografía	112

ÍNDICE DE FIGURAS		
1	Estructura del Receptor Muscarínico	6
2	Variación de la APTI posterior estimulación eléctrica del nervio vago o exposición a Metacolina	7
3	Representación esquemática de la distribución de los mAChRs en células caliciformes y músculo liso de vías aéreas	9
4	Efecto de la Pilocarpina en la permeabilidad al paso de aire en las vías respiratorias de acures	12
5	Efecto de la Galamina en la permeabilidad al paso de aire en las vías respiratorias de acures	13
6	Celularidad en los lavados broncoalveolares	14
7	Efecto de la Proteína Básica Principal (MBP) y la Peroxidasa eosinofílica (EPO) sobre la unión del antagonista muscarínico [3H] N-metilescopolamina (NMS)	16
8	Estructura de la Proteína G heterotriméricas	22
9	Modelo propuesto para la estructura de la Guanililciclase Particulada	30
10	Modelo de regulación dual de la NP-GC mediante receptores muscarínicos	32
11	Estructura de la Guanililciclase Soluble	33
12	Efecto de la concentración de carbamilcolina sobre la actividad contráctil del MLTB	35
13	Efecto del ODQ en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB	36
14	El efecto del ODQ sobre la actividad contráctil inducida por el agonista muscarínico carbamilcolina 10^{-5} M	37
15	Efecto del Mastoparén en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB	40
16	Curva dosis-respuesta de la contracción del músculo liso traqueal de bovino con carbamilcolina a diferentes concentraciones de Mastoparén	41
17	Actividad Guanililciclase estimulada por carbamilcolina [1×10^{-5} M] en el tiempo.	43
18	Identificación de las subunidades $\alpha 1$ y $\beta 1$ de la sGC en extractos crudos activado con carbamilcolina por Western blot	44

19	Sinopsis Metodológica	53
20	Efecto del Mastoparn a concentraciones crecientes en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB	62
21	Porcentaje de inhibición de los niveles de GMPc en las señales de 20 y 60 s en presencia de concentraciones crecientes de Mastoparn	63
22	Efecto de la PTX 200ng/ml sobre los niveles de GMPc inducidos por la activación muscarínica con carbamilcolina 10^{-5} M en el MLTB	64
23	Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc de fragmentos musculares pre-incubados con Mastoparn	65
24	Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc inducidos por Nitroprusiato de Sodio (SNP) $50\mu\text{M}$ en presencia de Mastoparn	66
25	Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc inducidos por CNP 10^{-7} en presencia de Mastoparn	67
26	Efecto de la PTX 200ng/ml sobre la contracción inducida por con carbamilcolina en el MLTB	69
27	Efecto del SNP $50\mu\text{M}$ sobre la actividad GC en fracciones P1+P2 y P1+P2 20''CC	70
28	Efecto de los péptidos C-Terminal sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7}M en fracciones P1+P2	72
29	Efecto de los péptidos C-Terminal sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP $50\mu\text{M}$	73
30	Efecto de los péptidos C-Terminal sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP $50\mu\text{M}$	74
31	Efecto de los Anticuerpos anti- $\alpha\text{Gi/o}$ y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7}M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 alquiladas con mostaza 4- DAMP	76
32	Efecto de los Anticuerpos anti- $\alpha\text{Gi/o}$ y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7}M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 pre-incubadas con anti-m3AChR	77
33	Efecto de los Anticuerpos anti- $\alpha\text{Gi/o}$ y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7}M y Mastoparn en fracciones P1+P2 alquiladas con mostaza 4-DAMP	80

34	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7} M y Mastoparán en fracciones P1+P2 pre-incubadas con anti-m3AChR	81
35	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7} M y Carbamilcolina o Mastoparán a sus máximas concentraciones en fracciones P1+ P2 Pre-incubadas con anti-m3AChR	82
36	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP 10^{-7} M y Carbamilcolina o Mastoparán a sus máximas concentraciones en fracciones P1+ P2 alquiladas con mostaza 4-DAMP	83
37	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 20"CC alquiladas con mostaza 4-DAMP	88
38	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 20"CC alquiladas con mostaza 4-DAMP	89
39	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Mastoparán en fracciones P1+P2 20"CC alquiladas con mostaza 4-DAMP	90
40	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Mastoparán en fracciones P1+P2 20"CC pre-incubadas con anticuerpos anti-m3AChR	91
41	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina o Mastoparán a sus máximas concentraciones en fracciones P1+P2 20"CC alquiladas con mostaza 4-DAMP	92
42	Efecto de los Anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina o Mastoparán a sus máximas concentraciones en fracciones P1+P2 20"CC pre-incubadas	93
43	Estructura de la PTX	96
44	Diagrama esquemático de la ADP-ribosilación de la subunidad α de la proteína heterotrimérica Gi / o por la toxina pertussis (PTX)	97

45	Modelo I	100
46	Modelo II	101
47	% Máximos de inhibición en fracciones P1+P2 y P1+P2 20''CC activadas con Carbamilcolina o Mastoparán y bloqueadas para receptor m3AChR mediante alquilación o anticuerpos anti-m3AChR	102
48	Modelo 3	103

ÍNDICE DE ESQUEMAS		
Esquema 1	Los segundos mensajeros asociados a la estimulación muscarínica en el MLVA	3
Esquema 2	Alineación de las subunidades $\beta 1-\beta 4$	25
Esquema 3	Secuencia de adición de reactivos durante la contracción del MLTB	53
Esquema 4	Secuencia de adición de reactivos durante la activación muscarínica del MLTB,	55
Esquema 5	Actividad de las NPR-GC-B o sGC expuestas a Péptidos C- terminales de las proteínas $\alpha Gi/o$	61
Esquema 6	Actividad de las NPR-GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC Alquiladas, expuestas a anticuerpos anti- $\alpha Gi/o$ anti- β y anti-m2AChR y activadas con Carbamilcolina o Mastoparán	62
Esquema 7	Actividad de las NPR-GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR y expuestas a anticuerpos anti- $\alpha Gi/o$ anti- β y anti-m2AChR y activadas con Carbamilcolina o Mastoparán	63

ÍNDICE DE TABLAS

1	Tipos de Proteínas G Heterotriméricas	20
2	Genes, localización y efectores de las subunidades β y γ	27
3	Interacciones entre las subunidades β y γ	28
4	Clasificación de las Guanililciclasas sensibles a Péptido Natriuréticos	32
5	Estructura del Mastoparén y de sus análogos Mastoparén 7 y Mastoparén 17	40
6	Reactivos utilizados discriminados por casa comercial	49
7	Anticuerpos, Epítopes y diluciones utilizadas para el bloquear de las proteínas α Gi/o, β , m2AChR y m3AChR	51
8	DE ₅₀ y % Máximo de Inhibición de las membranas P1+P2 en condición control	88
9	DE ₅₀ y % Máximo de Inhibición de las membranas P1+P2 20"CC en condición control	98

ABREVIATURAS	
7-TMR	Receptores de siete dominios transmembrana
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetil colina Esterasa
Actividad GEF	Actividad Intercambiadora de GTP/GDP (GTP/GDP exchange activity)
APTI	Índice de Presión/ Tiempo de las vías aéreas
CAT	Colina acetil transferasa
CC	Carbamilcolina
EPO	Peroxidasa eosinofílica
GAP	GTP-ase activating protein
GEF	GTP/GDP exchange factor
GPCR	Receptores Acoplados a Proteínas G
I2mAChR	Segundo lazo tansmembrana de los mAChRs
i3mAChR	Tercer lazo tansmembrana de los mAChRs
KRB	Krebs Ringer-bicarbonato
m1AChRs	Receptores muscarínicos M1
m2AChRs	Receptores muscarínicos M2
m3AChRs	Receptores muscarínicos M3
m4AChRs	Receptores muscarínicos M4
m5AChRs	Receptores muscarínicos M5
mAChRs	Receptores muscarínicos
MBP	Proteína básica principal
MLTB	Músculo liso traqueal de Bovinos
MLVA	Músculo liso de vías aéreas
MP	Mastoparén
N	Receptores Nicotínico
NANC	Sistema ni adrenérgico ni colinérgico
NO	Óxido nítrico
NPR-GC	pGC activadas por Péptidos Natriurético (Natriuretic Peptide Receptor-Guanylyl Cyclase)
NPR-GC-A	pGC activadas ANP y BNP
NPR-GC-B	pGC activadas CNP
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) : inhibidor específico de la sGC
pGC	Guanililciclaza Particulada
PTX	Toxina pertussis
sGC	Guanililciclaza Soluble
SNA	Sistema Nervioso Autónomo
TCA	Ácido tricloroacético
VIP	Péptido Intestinal Vaso Activo
WT	Wild Type



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Medicina y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la Tesis Doctoral presentada por: **WALID HASSAN SOTO** titular de la cédula de identidad N° 13.514.014, bajo el título ***“IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS G α HETEROTRIMÉRICAS SENSIBLES A MASTOPARÁN QUE INHIBEN A LAS GUANILILCICLASAS PARTICULADAS B Y SOLUBLE EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINOS”***, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído el trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 18 de marzo de 2021 a las 9:00 am, para que el autor lo defendiera en forma pública, lo que este hizo en el Salón 112 del Postgrado en Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina de la UCV, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual el autor respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado y a las medidas de **BIOSEGURIDAD** exigidas por la pandemia de COVID-19.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte original y un avance significativo en las rutas de señalización involucradas en la activación de las proteínas G y su relación con las guanililciclasas en el músculo liso traqueal de bovino. Esto tiene un impacto en el conocimiento de la fisiología y fisiopatología de los mecanismos de contracción y relajación. En la defensa y en la escritura de la tesis el aspirante demostró amplio dominio conceptual y excelente organización de las ideas.

3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 18 días del mes de marzo del año 2021, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del Jurado Ernesto TREJO.

José CARDIER

C.I. 4.888.119

IVIC

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Medicina

José BUBIS

C.I. 4.136.606

USB

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Medicina

Humberto ACEVEDO

C.I. 3.974.103

UCV

Jurado designado por el Consejo
Central de Estudios de Postgrado

Adolfo BREMA

C.I. 6.051.076

UNEFM

Jurado designado por el Consejo
Central de Estudios de Postgrado

Ernesto TREJO

C.I. 9.096.750

UCV

Tutor



**CERTIFICACIÓN DEL TUTOR
PARA LA ENTREGA DEL TRABAJO ACADÉMICO
EN FORMATO IMPRESO Y FORMATO DIGITAL**

Yo, Ernesto Trejo portador de la Cédula de identidad N° 9.096.750 en mi calidad de tutor del trabajo titulado IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS GI/O HETEROTRIMÉRICAS SENSIBLES A MASTOPARÁN QUE INHIBEN A LAS GUANILILCICLASAS

PARTICULADAS B Y SOLUBLE EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE BOVINOS realizado por el estudiante Walid Hassan Soto Ci 13514014. Certifico que este trabajo es la **versión definitiva**. Se incluyó las observaciones y modificaciones indicadas por el jurado evaluador. La versión digital coincide exactamente con la impresa.



Firma del Profesor: Ernesto Trejo 9.096.750

En caracas a los 12 días del mes de Abril de 2021

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
AUTORIZACIÓN PARA LA DIFUSIÓN ELECTRÓNICA DE TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO, TRABAJO DE GRADO Y
TESIS DOCTORAL DE LA FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.**

Nosotros Ernesto trejo , Itala lipo de Bécemberg y Walid Hassan Soto

Autores de la tesis "Identificación de las proteínas Gi/o heterotriméricas sensibles a mastoparén que inhiben a las guanililciclasas particuladas b y soluble en el músculo liso traqueal de bovinos"

Presentado por Walid Hassan para optar al título de Doctor en Ciencias Fisiológicas
Autorizo a la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, a difundir la versión electrónica de este trabajo, a través de los servicios de información que ofrece la Institución, solo con fines académicos y de investigación, de acuerdo a lo previsto en la Ley sobre Derecho de Autor, Artículo 18, 23 y 42 (Gaceta Oficial Nº 4.638 Extraordinaria, 01-10-1993).

x	<i>Si autorizo</i>
	<i>Autorizo después de 1 año</i>
	<i>No autorizo</i>
	<i>Autorizo difundir sólo algunas partes del trabajo</i>

Indique:

Firmas de los autores

		
C.I. Nº 9.096.750 e-mail: trejo.ernesto@gmail.com	C.I. Nº 1.875.525 e-mail: italalippo@gmail.com	C.I. Nº 13.514.014 e-mail: whassamsoto@hotmail.com

En Caracas , a los 12 días del mes de, Abril 2021

Nota: En caso de no autorizarse la Escuela o Coordinación de Estudios de Postgrado, publicará: la referencia bibliográfica, tabla de contenido (índice) y un resumen descriptivo, palabras clave y se indicará que el autor decidió no autorizar el acceso al documento a texto completo.

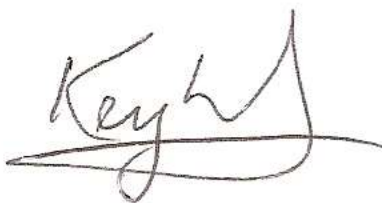
La cesión de derechos de difusión electrónica, no es cesión de los derechos de autor, porque este es intransferible.



Ernesto Trejo, CI. 9.096.750
E-mail trejo.ernesto@gmail.com
Tutor



Zury Dominguez , CI.3.812.873 .
E-mail zuryanadd@gmail.com
Directora



Keybel Diaz , CI.5.465.031
E-mail kdiazq@gmail.com
Coordinadora

Dedicatoria

- ❖ A mis padres Riad Hassan y Rosa de Hassan.
- ❖ A mi Amada esposa y compañera Trilusbel de Hassan.
- ❖ A mi Hermano Youssif Hassan Soto.
- ❖ A mis sobrinos: Omar Walid Hassan, Amal Valentina Hassan.
- ❖ A mis Tíos: Salah Hassan, Rahija Hassan y Eduardo Soto.
- ❖ A la memoria de mi querida Abuela: Ana Elisa Martínez.
- ❖ A la memoria de mis queridos Tíos: Bahija Hassan de Farhat, Eyad Hassan, Walid Hassan y Ahmad Abu Zaki.

Dedicatoria Especial

A mi hijo Riad Walid Hassan Saravia: hijo eres la persona que más amo en el mundo, todo lo que he hecho en la vida incluyendo este trabajo te lo dedico a ti.

... Tu padre que te Adora

Dedicatoria Especial

A la memoria de mi Gran Maestro el Dr. Marcelo José Alfonzo Rosas

A quien NUNCA recordaré en pasado porque sus lecciones siguen vivas
e iluminaron mi entendimiento en este arduo camino.

Resumen

Identificación de las Proteínas Gi/o heterotriméricas sensibles a Mastoparén que inhiben a las Guanililciclasas Particuladas B y Soluble en el Músculo Liso Traqueal de Bovinos

Walid Hassan Soto, Cl. 13.514.014, sexo: masculino, E-mail: whassansoto@hotmail.com Telf. 04265106267. Dirección: Los Chaguaramos Caracas. Postgrado en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Medicina Experimental.
Tutor: Ernesto Trejo, Cl. 9.096.750, sexo: masculino, E-mail: trejo.ernesto@gmail.com Telf. 04167267859. Dirección: Los Chaguaramos Caracas. Postgrado en Ciencias Fisiológicas, Instituto de Medicina Experimental.

Objetivo: Identificar las proteínas Gi/o heterotriméricas sensibles a Mastoparén y asociadas al m2AChR, que inhiben a las Guanililciclasas Particulada B (NPR-GC-B) y Soluble (sGC) en el músculo liso traqueal de bovinos (MLTB). **Métodos:** Se utilizaron fragmentos intactos de MLTB, para determinar actividad contráctil y los niveles de GMPc en presencia de agonistas e inhibidores. Adicionalmente, se utilizaron fracciones subcelulares de membrana de MLTB P1+P2 para medir la actividad de NPR-GC-B y P1+P220''CC para medir la actividad de la sGC en presencia de péptidos C-Terminal de la subunidad α . Por último, se emplearon fracciones P1+P2 y P1+P220''CC libre actividad del receptor muscarínico m3 (m3AChR) activadas con Mastoparén y Carbamilcolina, en presencia de anticuerpos anti-G α -i/o y β para identificar las proteínas Gi/o asociadas al m2AChR. **Resultados:** se encontró que el Mastoparén en MLTB intacto inhibe parcialmente la sGC, totalmente la NPR-GC y actúa como un inhibidor no competitivo de la contracción, tales efectos son a través de proteína Gi/o, ya que los mismos son revertidos con Toxina Pertussis (PTX), adicionalmente se encontró, que Mastoparén activa a las proteínas Gi/o asociadas al m2AChR, sin activar a dicho receptor. Los resultados mostraron que las proteínas Gi/o asociadas al m2AChR que inhiben a la NPR-GC-B pertenecen a la subfamilia α o1 β 4, y las que inhiben a las sGC son α i3 β 1. **Conclusión:** Las proteínas Gi/o pueden ser activadas directamente por Mastoparén, lo que puede constituir un mecanismo novedoso capaz de restituir la función moduladora que ejerce m2AChR sobre la permeabilidad de las vías aéreas.

Palabras Clave: Mastoparén, Toxina Pertussis (PTX), Receptor muscarínico m2 (m2AChR), Receptor muscarínico m3 (m3AChR), Guanililciclasa particulada B (NPR-GC-B), Guanililciclasa Soluble (sGC), Proteínas Gi/o, Péptidos C-Terminal de la subunidad α .

Identification of Mastoparan-sensitive heterotrimeric Gi/o Proteins that inhibit Particulate B and Soluble Guanylyl Cyclase in Bovine Tracheal Smooth Muscle

Objective: Identify the Gi /o heterotrimeric proteins sensitive to Mastoparan and associated with m2AChR, which inhibit Particulate B (NPR-GC-B) and soluble (sGC) Guanylyl Cyclase enzyme in bovine tracheal smooth muscle (BTSM). **Methods:** Intact BTSM fragments were used to determine contractile activity and cGMP levels in the presence of agonists and inhibitors. Additionally, subcellular membrane fractions of BTSM P1+P2 were used to measure the activity of NPR-GC-B and P1+P220°C to measure the activity of sGC in the presence of C-Terminal peptides of the α subunit. Finally, fractions P1+P2 and P1+P220°C free activity of the m3 muscarinic receptor (m3AChR) activated with Mastoparan and Carbamylcholine were used, in the presence of anti G α -i / o and β antibodies to identify the Gi/o proteins associated with m2AChR. **Results:** it was found that Mastoparan in intact MLTB partially inhibits sGC, totally NPR-GC and acts as a non-competitive inhibitor of contraction, such effects are through Gi/o protein, since they are reversed with Pertussis Toxin (PTX), additionally it was found that Mastoparan activates the Gi/o proteins associated with m2AChR, without activating the receptor. The results showed that the Gi / o proteins associated with m2AChR that inhibit NPR-GC-B belong to the α o1 β 4, subfamily and those that inhibit sGC are α i3 β 1. **Conclusion:** The Gi/o proteins can be activated directly by Mastoparan, which may constitute a novel mechanism capable of restoring the modulatory function that m2AChR exerts on the permeability of the airways.

Key Words: Mastoparan, Pertussis Toxin (PTX), m2 Muscarinic Receptor (m2AChR), m3 Muscarinic Receptor (m3AChR), Particulate Guanylyl Cyclase B (NPR-GC-B), Soluble Guanylyl Cyclase (sGC), Gi/o Proteins, C-Terminal Peptides of the α subunit.

I Introducción

El Sistema nervioso autónomo (SNA) controla muchos aspectos de la función respiratoria, entre los cuales destacan la regulación del tono de la musculatura lisa de las vías aéreas (MLVA) y la secreción de moco por parte de las glándulas submucosas, lo cual está vinculado con la permeabilidad al paso de aire.

El SNA está conformado por el sistema nervioso simpático, cuyo neurotransmisor principal es la noradrenalina y el sistema nervioso parasimpático, cuyo neurotransmisor es la acetilcolina (ACh). Este último actúa en las vías aéreas como broncoconstrictor mientras que el sistema simpático actúa como modulador (1-2).

Además de la influencia del SNA sobre el estado de permeabilidad de las vías aéreas se ha demostrado la existencia de un sistema no adrenérgico no colinérgico (NANC) que puede actuar como broncodilatador (mediante la activación de enzimas como las Guanililciclasas Solubles y Particuladas activadas por Óxido Nítrico y Péptidos Natriuréticos, respectivamente; además de otros péptidos como el intestinal vaso activo (VIP), entre otros) y como broncoconstrictor (a través de sustancias como la Serotonina, la Histamina y el Neuropeptido Y, entre otros) (3).

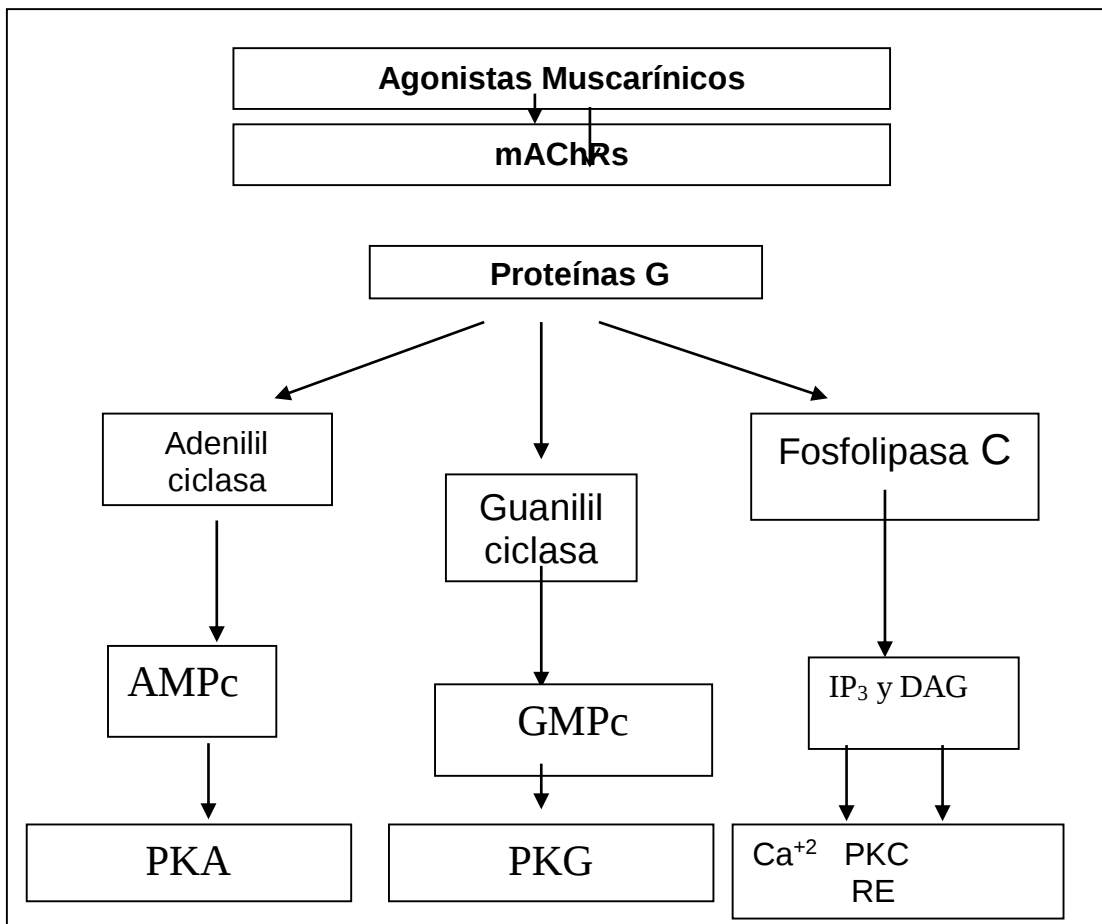
Por lo tanto, el estado de permeabilidad de las vías aéreas es controlado por múltiples señales que son reconocidas por el MLVA gracias a una variedad de familias de receptores, los cuales, en su mayoría pertenecen a los receptores de siete dominios transmembrana (7-TMR) que actúan acoplados a proteínas G heterotriméricas (G-Protein Coupled Receptor, GPCR). Entre estos receptores destacan, en el MLVA, los receptores muscarínicos (mAChRs) que son activados en condiciones fisiológicas por la ACh liberada por las fibras colinérgicas eferentes que provienen del nervio vago y que se encuentran ampliamente distribuidos, a nivel de todo el árbol bronquial (1,4).

La ACh es un neurotransmisor sintetizado por la enzima colina acetil transferasa (CAT), la cual cataliza la reacción de unión de la acetilcoenzima A y la

colina proveniente de fosfolípidos de membrana (fosfatidilcolina) o del sistema de recaptura de colina del terminal nervioso, posteriormente, es almacenada en vesículas, y liberada tras la despolarización de la membrana celular. Una vez liberada, los efectos funcionales de la ACh finalizan principalmente por la acción de la acetilcolinesterasa (AChE) (1,4).

1.1 Importancia de los Receptores Muscarínicos en el MLVA

Los mAChRs son proteínas monocatenarias pertenecientes a la familia de receptores GPCR. La unión de la ACh a los mAChRs, activa a un conjunto de enzimas efectoras primarias como son la Adenililciclase, Guanililciclase y la Fosfolipasa C, que generan los segundos mensajeros AMPc, GMPc e IP₃ y DAG, respectivamente, (**Esquema 1**). La generación de estos segundos mensajeros produce una serie de respuestas fisiológicas a saber: contracción del MLVA, estimulación de secreciones mucosas y un incremento en el transporte de iones a través del epitelio bronquial entre otras, que pueden exacerbarse en condiciones patológicas que cursen con aumento de su liberación (5-6).



Esquema 1. Segundos mensajeros asociados a la estimulación muscarínica en el MLVA (4).

Las técnicas de clonamiento molecular han revelado la existencia de cinco subtipos de mAChRs (m1-m5) (6). Estructuralmente, estos receptores poseen siete regiones α -hélice transmembrana con cuatro dominios extracelulares y cuatro dominios intracelulares, entre los cuales destaca el prominente lazo citoplasmático que se forma entre el quinto y sexto dominio transmembrana denominado i_3 mAChR, que es el sitio de contacto entre los mAChRs y sus proteínas G heterotriméricas asociadas (**Figura 1**). Estas últimas funcionan como “interruptores moleculares” que en su estado activo sirven de puente entre las señales extracelulares y las enzimas efectoras primarias (**Esquema 1**).

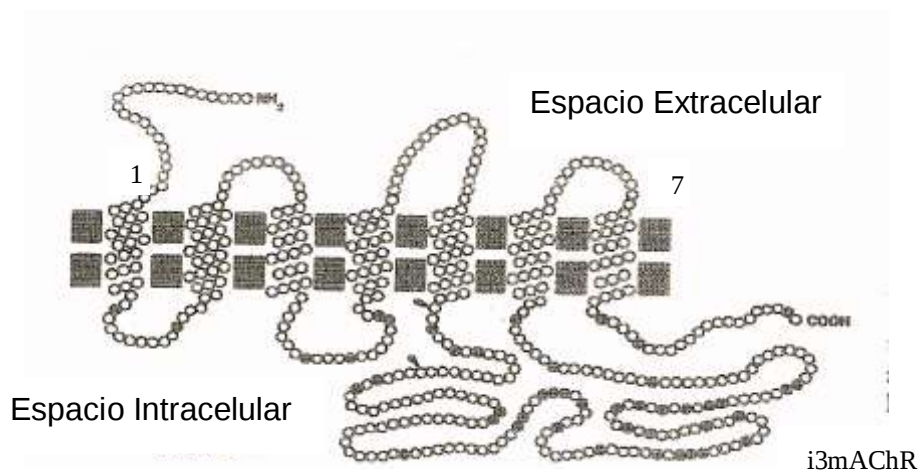


Figura 1. Estructura del Receptor Muscarínico (5).

Los mAChRs pueden ser clasificados de acuerdo con su función en:

- Subtipos m1, m3 y m5; los cuales estimulan la liberación de los segundos mensajeros intracelulares del tipo IP_3 y DAG.
- Subtipos m2 y m4 los cuales inhiben la Adenililciclase.

En el músculo liso traqueal de bovinos (MLTB) se expresan los mAChRs de los tipos m_2 AChR y m_3 AChR que se han identificado farmacológicamente en una proporción de 4:1, respectivamente (7-8).

Existen evidencias que indican que el receptor m_3 AChR es responsable de la contracción de las vías aéreas mientras que el receptor m_2 AChR modula dicho proceso (9). Esto ha sido demostrado en ratones knock-out para el receptor m_2 AChR o m_3 AChR, en un modelo en que se usó como agonista la Metacolina, o mediante la estimulación eléctrica del nervio vago *in vivo*; el efecto de ambos estímulos sobre el estado de permeabilidad de las vías aéreas fue cuantificado mediante el empleo de un parámetro denominado Índice de Presión/Tiempo de las vías aéreas (Airway pressure time-index, APTI) el cual permite medir la modificación que sufre la presión proximal de las vía aéreas durante los ciclos respiratorios; de lo cual obtuvieron como resultado que en los ratones knock-out para m_2 AChR aumenta el APTI significativamente con respecto a los Wild type (WT) lo que es indicativo de un aumento en la broncoconstricción, mientras que para los ratones knock-out para m_3 AChR se observa que APTI se mantiene en cero o por debajo de este valor lo que indica ausencia de broncoconstricción, de estos resultados podemos concluir que los m_3 AChR son responsables de la contracción del MLVA y los m_2 AChR son moduladores del m_3 AChR (9) **(Figura 2).**

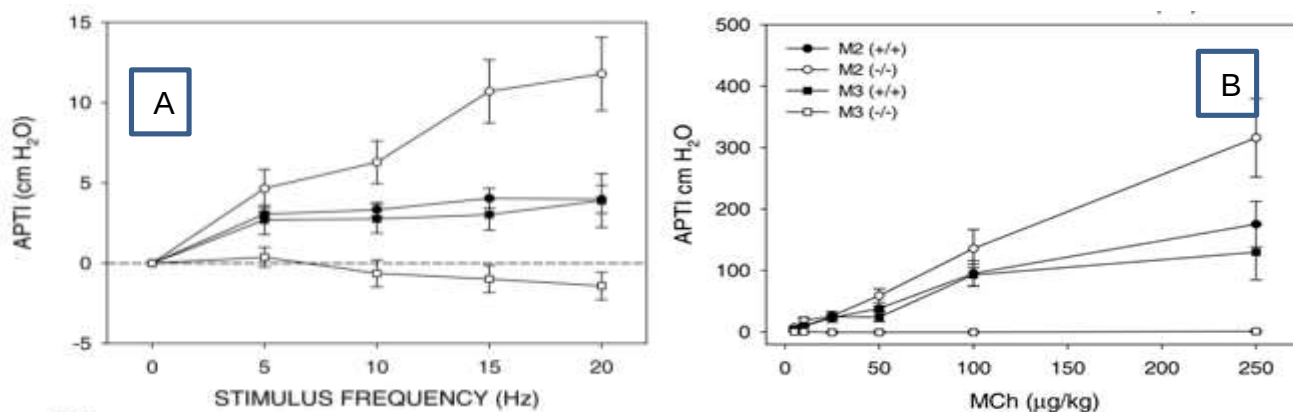


Figura 2. Variación de la APTI posterior a la estimulación eléctrica del nervio vago o exposición a la Metacolina. En el **Panel A** se muestra el APTI medido durante la estimulación eléctrica del nervio vago de los ratones knock out para M2 y M3 y sus respectivos controles WT. En el **Panel B** se muestra el APTI en los ratones antes mencionados posterior a la administración de Metacolina (Mch) intravenosa en un rango entre 5-250 mg/kg. Los resultados corresponden al Promedio $\pm$ el error muestral estandarizado ($n=7$ por genotipo) (9).

1.2 Distribución de los Receptores Muscarínicos en las vías aéreas.

La liberación de acetilcolina neuronal está regulada por una red de nervios aferentes y eferentes de las vías aéreas que interactúan con sus células circundantes. Es importante señalar, que el tracto respiratorio es inervado por el nervio vago el cual hace sinapsis en el ganglio tisular parasimpático que se ubica en el tejido respiratorio, el mismo posee a nivel post-sináptico a los receptores colinérgicos nicotínicos (N) y muscarínicos m1AChR, y a nivel presináptico al autorreceptor m2AChR que regula la liberación de acetilcolina. Desde este ganglio se proyectan axones que hacen sinapsis en células productoras de moco y en el MLVA, los cuales son los tipos celulares vinculados con la regulación del flujo de aire (**Figura 3**).

La producción de moco en las vías aéreas centrales está bajo control colinérgico, este es una película protectora que sirve para evitar que las partículas inhaladas dañen el epitelio de las vías respiratorias. Se compone de electrolitos, agua y contiene altas cantidades de mucinas. Las células secretoras de moco en las vías aéreas centrales incluyen células caliciformes, que están incrustadas en el epitelio, y las glándulas submucosas que están conectadas a la luz de las vías respiratorias. Las glándulas submucosas reciben aferencias provenientes del ganglio tisular parasimpático y expresan a nivel presináptico al autorreceptor m2AChR y a nivel postsináptico a los receptores muscarínicos funcionales m1AChR y m3AChR, en una proporción de 1:2. El m3AChR es el receptor predominante que media la secreción de moco, mientras que la secreción de electrolitos y agua está controlada por los receptores muscarínicos m3AChR, en cooperación con los receptores m1AChR. (**Figura 3**) (4).

Por otra parte, en el MLVA como mencionamos anteriormente la relación m2AChR/m3AChR es de 4:1 (7) siendo el receptor m2AChR el autorreceptor presináptico y a nivel postsináptico modulador del receptor m3AChR, este receptor a diferencia de m3AChR, se hace disfuncional en cuadros inflamatorios que cursen con

eosinofilia *in situ* lo que genera aumento en la secreción de acetilcolina debido a la desregulación de los autorreceptores m2AChR con sus consecuentes efectos sobre la contracción del MLVA y la producción de moco lo que deriva en broncoconstricción, la misma ha sido estudiada según los modelos que presentaremos a continuación (10-16).

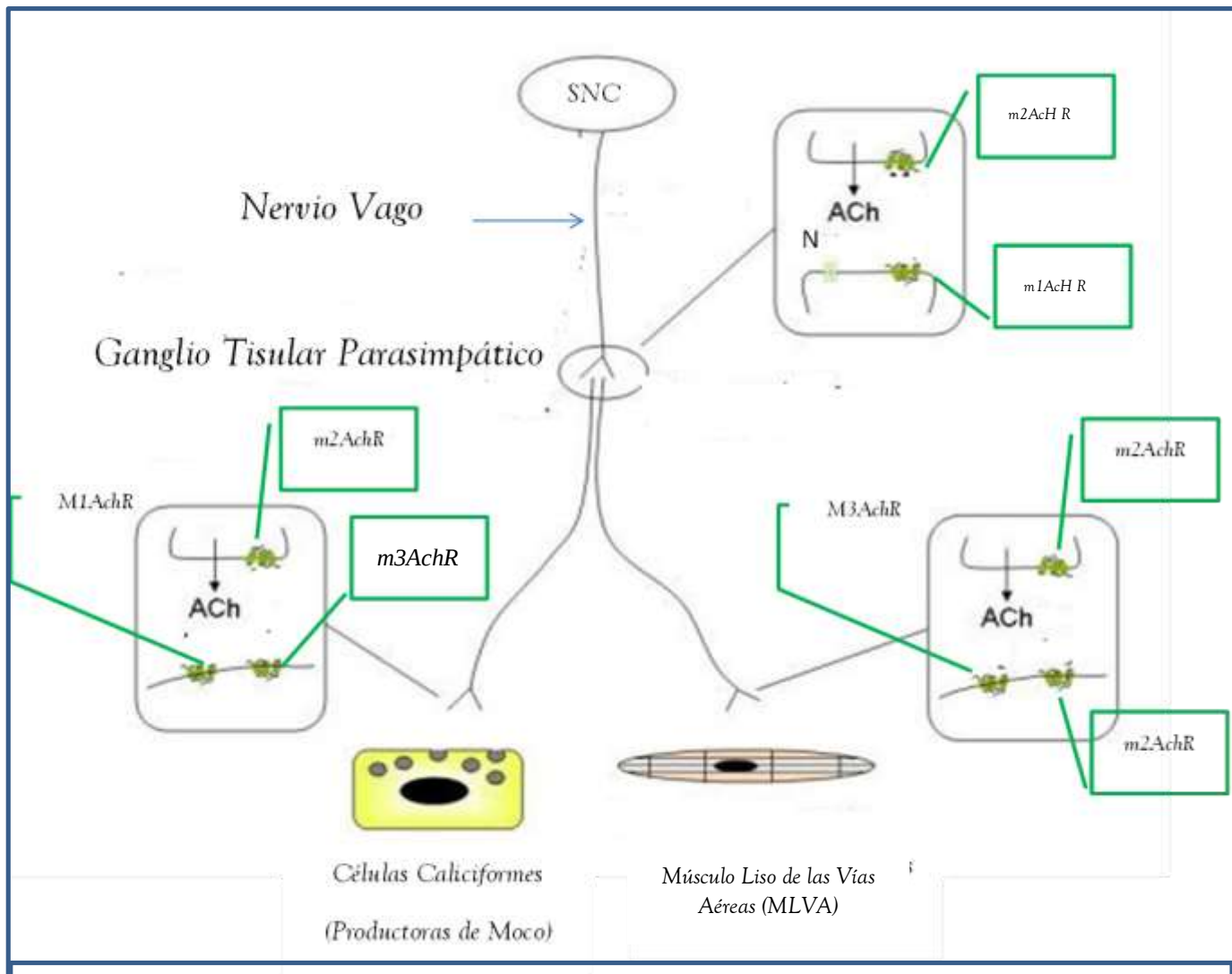


Figura 3. Representación esquemática de la distribución de los mAChRs en células caliciformes y músculo liso de vías aéreas. La Acetilcolina (ACh) actúa sobre las células productoras de moco y las células musculares lisas a través de sus receptores m2AChR y m3AChR en músculo liso de vías aéreas y m1AChR y m3AChR en células caliciformes. La ACh proviene de la liberación ganglionar la cual es modulada por una retroalimentación negativa de ACh sobre el autorreceptor m2AChR presináptico (4).

1.3 Disfuncionalidad del m2AChR

La disfunción del receptor m2AChR ha sido estudiada, *in vivo*, en acures en presencia de uno de los agentes de mayor importancia causantes de la pérdida de funcionalidad del m2AChR como es el alérgeno ovoalbúmina, el cual es capaz de generar eosinofilia *in situ* por mecanismos asociados a la IL-5. Para el desarrollo de estos estudios, los autores utilizaron agonistas o antagonistas selectivos del receptor m2AChR, a saber, la pilocarpina (agonista muscarínico del m2AChR), y galamina, (antagonista muscarínico selectivo m2AChR) (10).

Como lo muestra la **Figura 4, panel A**, en ausencia de pilocarpina el cambio en el tono muscular inducido por estimulación eléctrica del nervio vago no difiere estadísticamente entre el grupo de animales control, los previamente sensibilizados con ovoalbúmina y los previamente sensibilizados con ovoalbúmina pre-tratados con anticuerpos anti-IL-5. En el panel B se muestra que en presencia de pilocarpina se produjo, broncodilatación inducida por el estímulo eléctrico, que aumenta de forma dosis dependiente en los grupos control y de animales sensibilizados con ovoalbúmina pre-tratados con anticuerpos anti-IL-5. Sin embargo, este efecto no se observa en los animales sensibilizados, donde solo ocurre un modesto efecto a la dosis máxima de pilocarpina (**Figura 4, panel B**).

Al evaluar, con el mismo modelo experimental, el efecto del antagonista m2AChR galamina, se muestra que en ausencia de galamina la estimulación eléctrica del nervio vago genera broncoconstricción que no muestra diferencias significativas entre los tres grupos antes mencionados (**Figura 5, panel A**), mientras que la galamina potenció la broncoconstricción inducida por la estimulación eléctrica del nervio vago en los animales control y los sensibilizados con ovoalbúmina pre-tratados con anti-IL-5. Por el contrario, en los animales sensibilizados, sin pretratamiento con anti-IL-5, la galamina pierde parcialmente el efecto broncoconstrictor (**Figura 5, panel B**).

Estos resultados permiten concluir:

1. La sensibilización antigénica induce disfunción del receptor m2AChR que se observa en la disminución en la broncodilatación y broncoconstricción inducidos por pilocarpina y galamina respectivamente.
2. El pre-tratamiento de los animales sensibilizados con el anticuerpo anti-IL-5, restaura la respuesta del receptor M2 (10).

Es de destacar que resultados similares han sido obtenidos con la exposición de animales a ozono (11), pesticidas (12) y virus como el de parainfluenza (13); en todos los casos los efectos son revertidos por anticuerpos anti-IL-5, lo que establece una clara relación entre broncoconstricción, eosinofilia y disfuncionalidad del m2AChR (14-15), razón por la cual el mismo grupo de investigadores analizaron la celularidad en lavados broncoalveolares de los animales en cada condición experimental (**Figura 6**). Los resultados muestran un aumento de la celularidad en los animales expuestos a ovoalbúmina en comparación con el control y aquellos pre-tratados con anticuerpos anti IL-5 (10).

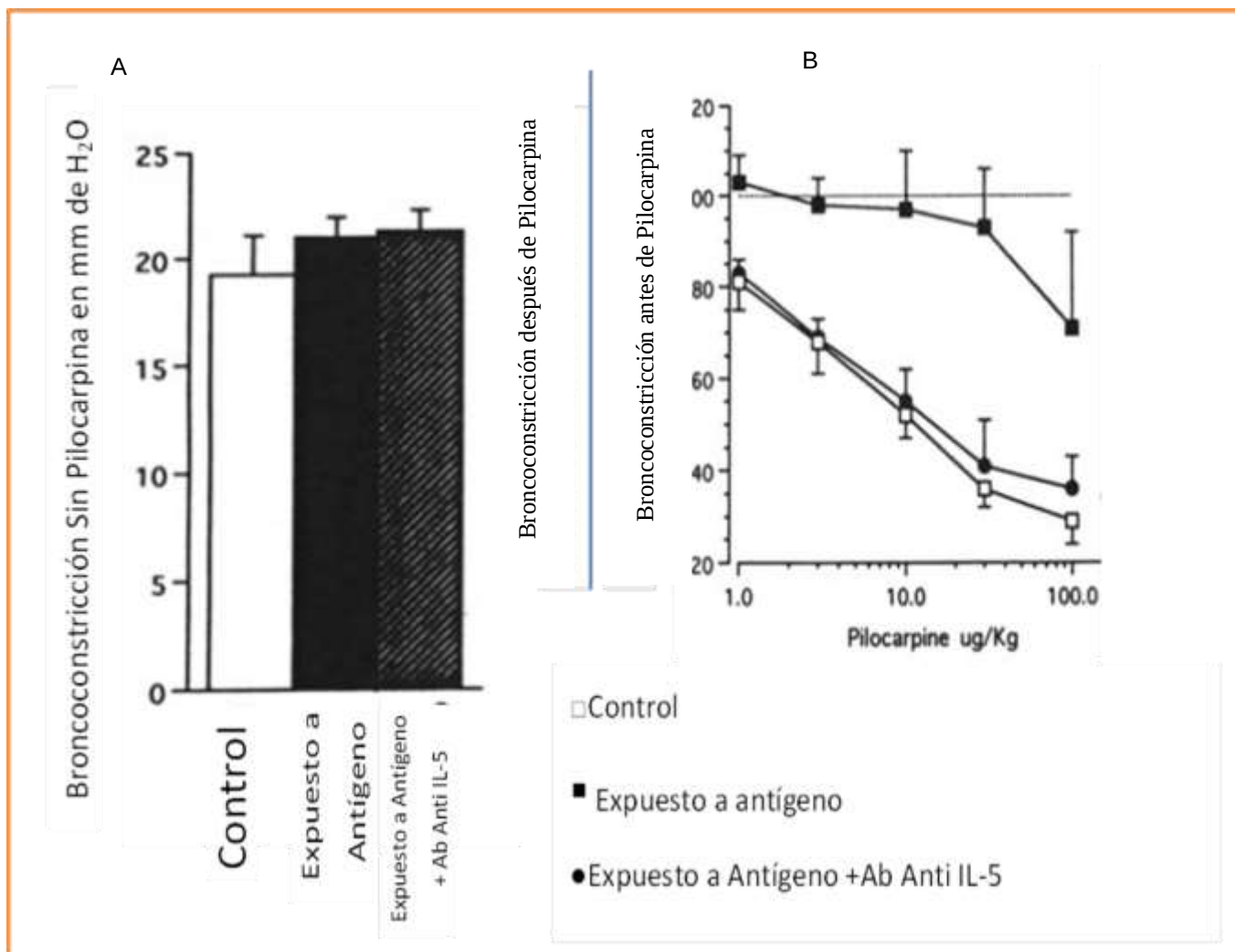
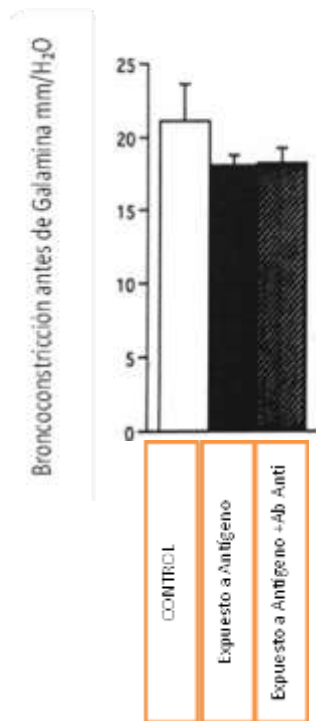
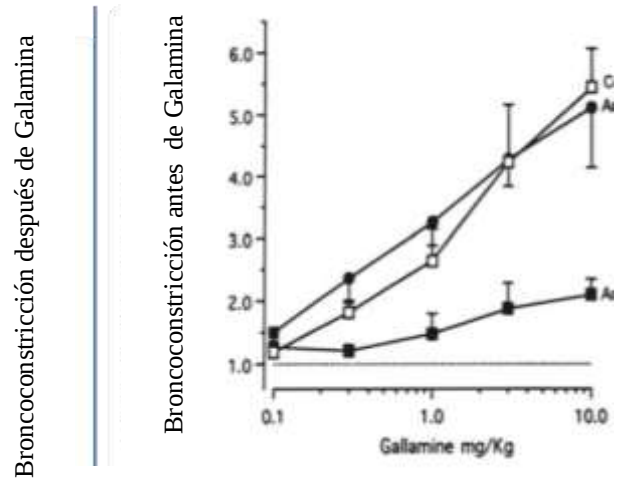


Figura 4. Efecto de la Pilocarpina sobre la permeabilidad al paso de aire en las vías respiratorias de acures. Panel A, Broncoconstricción basal sin pilocarpina Los acures control, los previamente sensibilizados con ovoalbúmina y los previamente sensibilizados con ovoalbúmina pre-tratados con anti-IL-5, reciben la estimulación eléctrica vagal de 2 Hz, 0,2 ms, 13.3 ± 3.1 V, 45 pulsos/tren en ausencia de pilocarpina. **Panel B** mismo experimento a concentraciones crecientes de pilocarpina (10).

A



B



□ Control

■ Expuesto a antígeno

● Expuesto a Antígeno + Ab Anti-IL-5

Figura 5. Efecto de la Galamina sobre la permeabilidad al paso de aire en las vías respiratorias de acures. Panel A, Broncoconstricción basal sin galamina: Los acures control, los previamente sensibilizados con ovoalbúmina y los previamente sensibilizados con ovoalbúmina pre-tratados con anti-IL-5, reciben la estimulación eléctrica vagal de 15 Hz, 0,2 ms, $58,5 \pm 2,8$ V, 75 pulsos/tren en ausencia de galamina. **Panel B** mismo experimento a concentraciones crecientes de galamina (10).

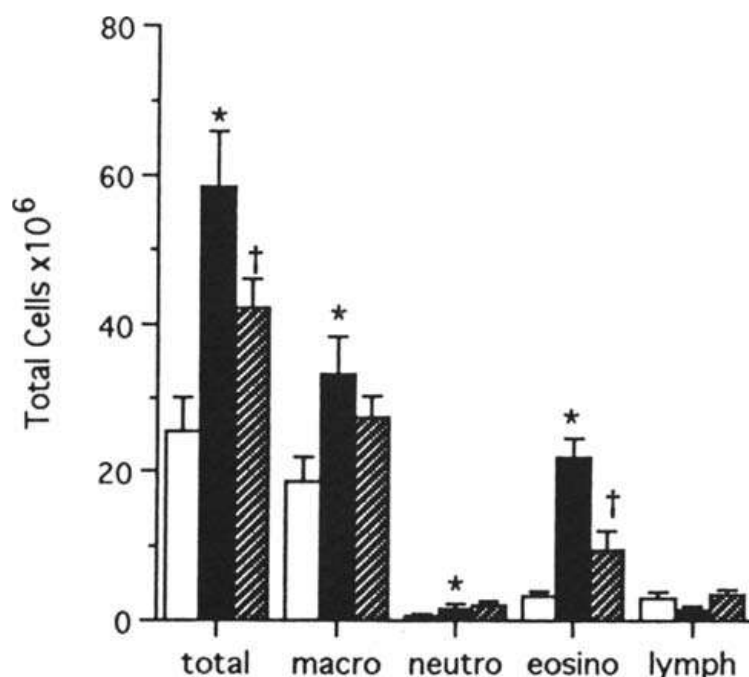


Figura 6. Celularidad en los lavados broncoalveolares. El conteo celular de lavados broncoalveolares realizado a acures control (barras vacías), expuestos a antígenos (Barras negras) y en acures expuestos a antígenos en presencia de anticuerpos anti IL-5 (barras trazadas) (10).

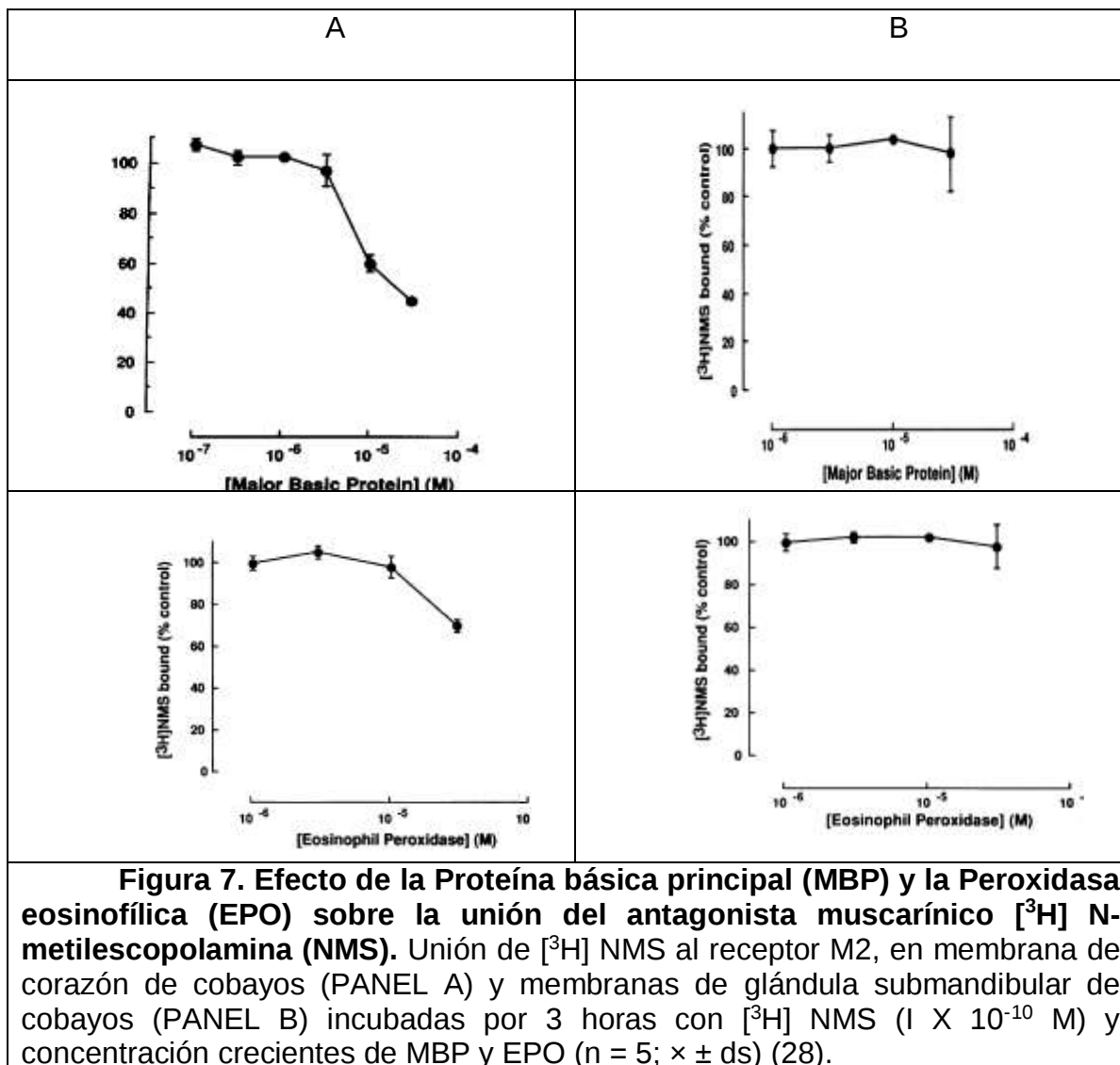
El aumento en la celularidad ocurre a expensas de los eosinófilos, cuya cantidad va de menos de 5% en condiciones control, a más de 20% al exponerse a antígenos. Esto representa alrededor de un 300% en el aumento de número de eosinófilos con respecto a la condición control, mientras que los macrófagos aumentan cerca de un 70%. Es importante destacar que la eosinofilia es revertida significativamente en presencia de anticuerpos ant-IL-5, lo cual demuestra la relación existente entre esta citosina y la eosinofilia *in situ* (10). La migración de los eosinófilos a los pulmones es mediada por proteínas de membrana presentes en las células nerviosas, conocidas como VLA-4 o antígeno-4 moléculas que aumentan su expresión en cuadros de Asma o en la EPOC. Estudios en los cuales se bloqueó selectivamente la proteína VLA-4 mostraron una disminución significativa de la infiltración eosinofílica (16-18).

Una vez que los eosinófilos llegan, por el efecto quimiotáctico, al tejido respiratorio se degranulan lo cual incrementa las concentraciones extracelulares de proteínas que se caracterizan por tener secuencias poli-lisínicas y poli-arginínicas conocidas como **Proteínas Catiónicas Eosinofílica** entre las cuales destacan la Proteína Básica Principal (MBP) y la Peroxidasa Eosinofílica (EPO) que actúan como antagonistas del m2AChR (19-23).

La acción de estas proteínas sobre los receptores muscarínicos ha sido estudiada en tejidos que expresan una densidad uniforme de receptores m2AChR y m3AChR; como lo son las membranas plasmáticas de corazón de cobayo, que expresan exclusivamente el receptor m2AChR (24-25), y membranas de glándula submandibular de cobayos, que solo expresan receptores m3AChR (26-27).

Tal como se muestra en los resultados (**Figura 7**) tanto las MBP y las EPO actúan como antagonistas del receptor muscarínico m2AChR, ya que ambas redujeron significativamente la unión del antagonista muscarínico [³H] N-metilescopolamina en membranas de corazón de cobayo. Por el contrario, en las membranas plasmáticas de glándula submandibular no hubo inhibición de la unión del antagonista. Sobre la base de estos resultados se puede concluir que el efecto antimuscarínico de las proteínas cationicas eosinofílicas es exclusivamente anti-m2AChR (28).

Trabajos posteriores demuestran que con el uso de anticuerpos anti-MBP y de heparina (molécula polianiónica) se pueden revertir los efectos antagonistas de las MBP y EPO sobre el m2AChR. Por otra parte, las taquicininas también protegen la función de los receptores m2AChR mediante la inhibición de la degranulación de eosinófilos (29).



1.4 Mecanismos Moleculares de Activación de los mAChRs y sus Proteínas G heterotriméricas asociadas.

Una vez analizada la importancia de los mAChRs y los factores que afectan su funcionamiento en las vías aéreas, es importante analizar que ocurre a nivel molecular cuando se activan los mAChRs e interaccionan con sus proteínas G heterotriméricas asociadas; en este sentido podemos señalar que la unión del agonista muscarínico al mAChR produce cambios en las orientaciones relativas de las hélices transmembrana 3 y 6 de dicho receptor; estos cambios afectan la conformación de las asas intracelulares de los receptores que interactúan con las proteínas G en su forma α -GDP $\beta\gamma$ con lo cual se promueve la exposición de los sitios de unión a GTP (actividad GEF) que se encontraban enmascarados en la subunidad α lo que conduce al intercambio del GDP por el GTP, lo cual induce la separación de la subunidad α -GTP del dímero $\beta\gamma$ (30).

El sitio más importante de contacto de la subunidad α con el receptor “activado” se encuentra hacia la región C-terminal de dicha subunidad, los estudios que utilizan subunidades α quiméricas sugieren que estos residuos contribuyen en la interacción específica con los receptores. Por otro lado, en los mAChRs se han encontrado una serie de residuos de aminoácidos que son críticos para un adecuado reconocimiento de las proteínas G. Estos aminoácidos establecen dominios de unión y activación que están localizados en la segunda (i_2) y la tercera (i_3) asa intracelular de estos receptores. Específicamente, se han encontrado residuos hidrofóbicos en la porción N-terminal del asa i_3 mAChR que participan en el acoplamiento selectivo receptor/proteína G (31).

Adicionalmente, el análisis sistemático por medio de mutagénesis sitio-dirigida indica la existencia de residuos de aminoácidos críticos para la activación de las proteínas G por parte de los mAChRs, estos aminoácidos son Ala448, Ala489, Leu492, y Ser493, los cuales conforman una superficie hidrofóbica en el asa i_3 que es determinante para el reconocimiento de las proteínas G heterotriméricas (32). Por otra parte, en el asa intracelular i_2 , se han identificado por lo menos cuatro residuos

hidrofílicos en el receptor m4AChR (Ser 168, Arg 171, Arg 176 y Arg 183) que son críticos para el reconocimiento selectivo de las proteínas Gq (32).

1.5 Las Proteínas G Heterotriméricas: Estructura y Función

Los receptores muscarínicos, al igual que el total de los receptores de siete dominios transmembrana (aproximadamente 900 subtipos), ejercen su efecto a través de proteínas transductoras de señales denominadas Proteínas G Heterotriméricas. Estos complejos multiproteicos actúan como “interruptores moleculares” que transducen las señales provenientes del medio extracelular a través de la membrana plasmática, siendo éstas en su estado activo el puente entre las señales extracelulares y las proteínas efectoras primarias (**Esquema 1**). Dichos ligandos extracelulares pueden ser de diversa naturaleza fisicoquímica como: hormonas, citoquinas, neurotransmisores, olores, luz etc. (33-35).

Las Proteínas G Heterotriméricas están constituidas por tres subunidades denominadas $\alpha\beta\gamma$. En su estado inactivo, la subunidad α se encuentra unida al GDP formando el complejo α -GDP $\beta\gamma$ de alta afinidad, el cual se desestabiliza cuando se intercambia GDP por GTP producto de la interacción del receptor con su ligando, lo que genera una subunidad α -GTP disociada del dímero $\beta\gamma$ (actividad GEF, GTP/GDP exchange factor) (34), los cuales son capaces de interactuar de manera independiente con distintos efectores a nivel intracelular y regulan diversas cascadas de señalización. La inactivación de estas proteínas G tiene lugar cuando se produce la hidrólisis del GTP a GDP por una actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α , la cual también puede ser inducida por unas proteínas denominadas GAP (GTP-ase activating protein) lo que trae como consecuencia la reasociación de la subunidad α -GDP con el dímero $\beta\gamma$ y el regreso a su estado inactivo bajo la forma α -GDP $\beta\gamma$ (35). Las proteínas G heterotriméricas se pueden clasificar funcionalmente en cuatro familias las cuales comparten características comunes como la inactivación por toxinas y la modulación de proteínas efectoras (**Tabla 1**) (35).

Tabla 1. Tipos de Proteínas G Heterotriméricas (30).		
Familia	Toxina responsable de la ADP-Ribosilación	Proteína Efectora
Familia G_s		
G _{αs1} G _{αs2} G _{αs3} G _{αs4} G _{αolf}	Colérica (CTX)	Adenilil ciclasa (activación)
Familia G_i		
G _{αi1} G _{αi2} G _{αi3}	Pertussis (PTX)	Adenilil ciclasa (inhibición) Canales de K ⁺ (activación) Canales de Ca ²⁺ (inhibición) Fosfolipasa C (activación) Fosfolipasa A ₂
G _{αo1} G _{αo2}	Pertussis (PTX)	Canales de K ⁺ (activación) Canales de Ca ²⁺ (inhibición)
G _{αt1} G _{αt2}	Colérica (CTX) y Pertussis(PTX)	Fosfodiesterasa (activación) asociada al sistema de la rodopsina
G _{αz} G _{αgust}		Adenilil ciclasa (inhibición)
Familia G_q		
G _{αq11} G _{αq12} G _{αq15} G _{αq16}		Fosfolipasa C (activación)
Familia G₁₂		
G _{α11}		Activa el intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
G _{α12}		Activa el intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺

Desde el punto de vista estructural, como se ilustra en la **Figura 8**, las subunidades α contienen dos dominios altamente conservados, un dominio helicoidal que mantiene al GTP en el centro de la proteína y otro dominio GTPasa el cual es estructuralmente idéntico al de la superfamilia de las GTPasas monoméricas que incluyen a las proteínas G pequeñas y a los factores de elongación.

El dominio GTP-asa está conformado por 6 hebras β plegadas paralelas rodeadas de 5 α -hélices. Adicionalmente, existen 5 motivos desordenados (loops) que contienen secuencias consenso para la unión de nucleótidos de Guanina:

1. GXGESGKS: motivo de unión para el difosfato del GDP
2. RXXXTXGI y DXXG: motivos de unión al magnesio
3. NKXD y TCAT: motivos de unión del anillo de Guanina (33-34).

Por otra parte, existen 3 motivos desordenados alrededor del fosfato- γ denominados interruptores moleculares (Switches) I, II y III que han sido descritos como los motivos de unión a proteínas efectoras. Estas estructuras muestran arreglos espaciales muy distintos cuando la proteína se encuentra unida a GDP o a GTP (33-34), lo cual supone que la actividad GEF genera dos tipos de conformaciones:

1. Conformación adoptada en presencia de GTP (α -GTP) que supone la estructura apropiada para la unión a proteínas efectoras.
2. Conformación adoptada en presencia de GDP (α -GDP $\beta\gamma$) que supone la conformación en la cual la subunidad α -GDP interactúa con los dímeros $\beta\gamma$ a través de los Switches I, II y III y/o las estructuras análogas en el dímero $\beta\gamma$, lo cual produce la neutralización simultánea de los motivos implicados en la interacción de estas proteínas con los efectores, lo que genera en este estado una inactivación mayor del 80 % de la subunidad α -GDP (33-37).

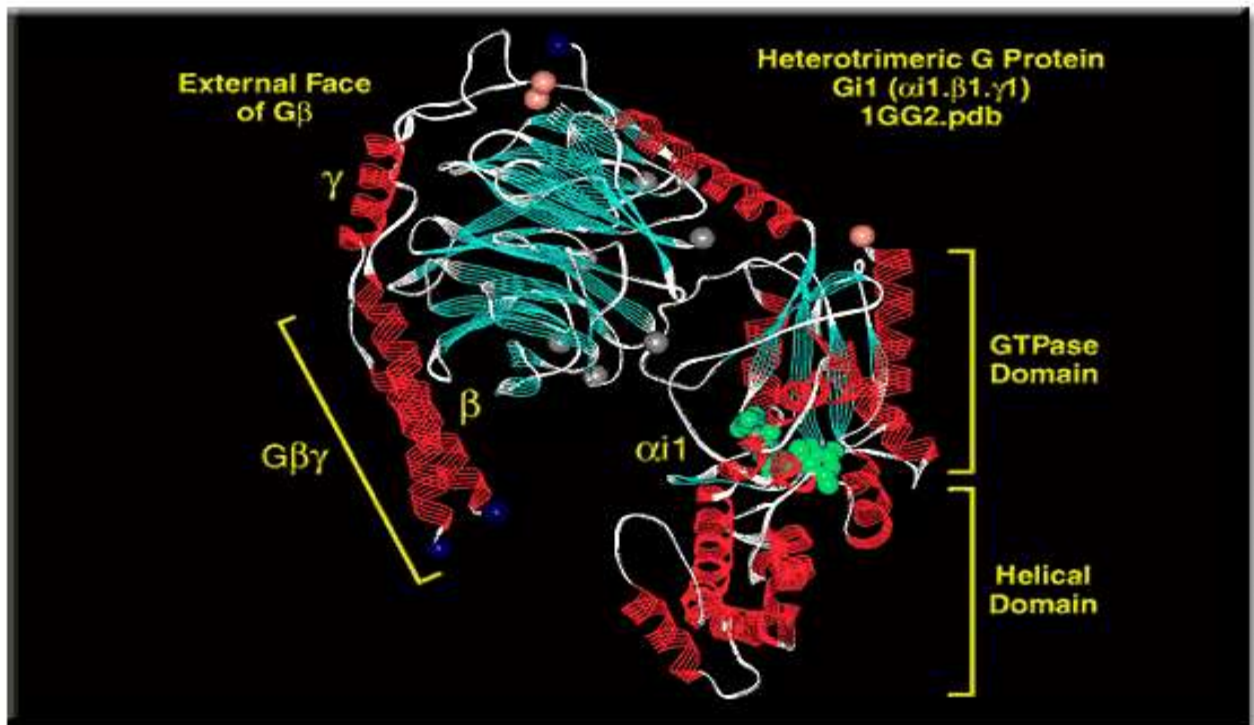


Figura 8. Estructura de la Proteína Gi1 ($\alpha_1\beta_1\gamma_1$) heterotriméricas (tomado de la página web dir.niehs.nih.gov/.../)

Tales cambios conformacionales están relacionados con un aumento en la capacidad de asociación de las proteínas G heterotriméricas con sus efectores, ya que las subunidades α -GDP no resultan inactivas en un 100% (36-39). Esto último es debido a que los extremos C-terminales que son los dominios activadores de las proteínas efectoras no resultan solapados por el dímero $\beta\gamma$, lo cual se conoce como hipótesis de LATCH o del cierre. Tal hipótesis ha sido confirmada en varias aproximaciones experimentales entre las que se encuentra las de Bruges y col. (37) quienes describen que el péptido que posee las secuencias del dominio C-Terminal de la proteína $G\alpha_{q16}$ (NIRKVFVDVRDSVLAARYLDEINLL) es capaz de activar a la Guanililciclase particulada tipo B (NPR-GC-B) en una fracción del sarcolema del MLTB (37).

Las subunidades α se caracterizan por poseer en su extremo N-Terminal, un motivo para la inserción de ácidos grasos, los cuales anclan a la subunidad α en la membrana y estabilizan los heterotrímeros. Todas las familias de proteínas G, a

excepción de G_t , poseen cisteínas en sus extremos amino terminal, las cuales pueden ser palmitoladas de manera reversible por enzimas tioesterasas. Sin embargo, a las subunidades α de la familia G_i se les unen irreversiblemente varias moléculas de ácido mirístico (ácido graso de 14 carbonos) en el extremo amino terminal de estas proteínas (41-43).

Por otra parte, la función de los dímeros $\beta\gamma$ estaba originalmente asociada con la finalización de la activación de las subunidades α -GTP. Sin embargo, se demostró que estos dímeros pueden estar asociados a activación de: los canales de K^+ en células atriales (31), PLC β_3 , adenililciclase, quinasa de receptores β adrenérgicos, PI-3 quinasa, canales de calcio, entre otros efectores (32-34).

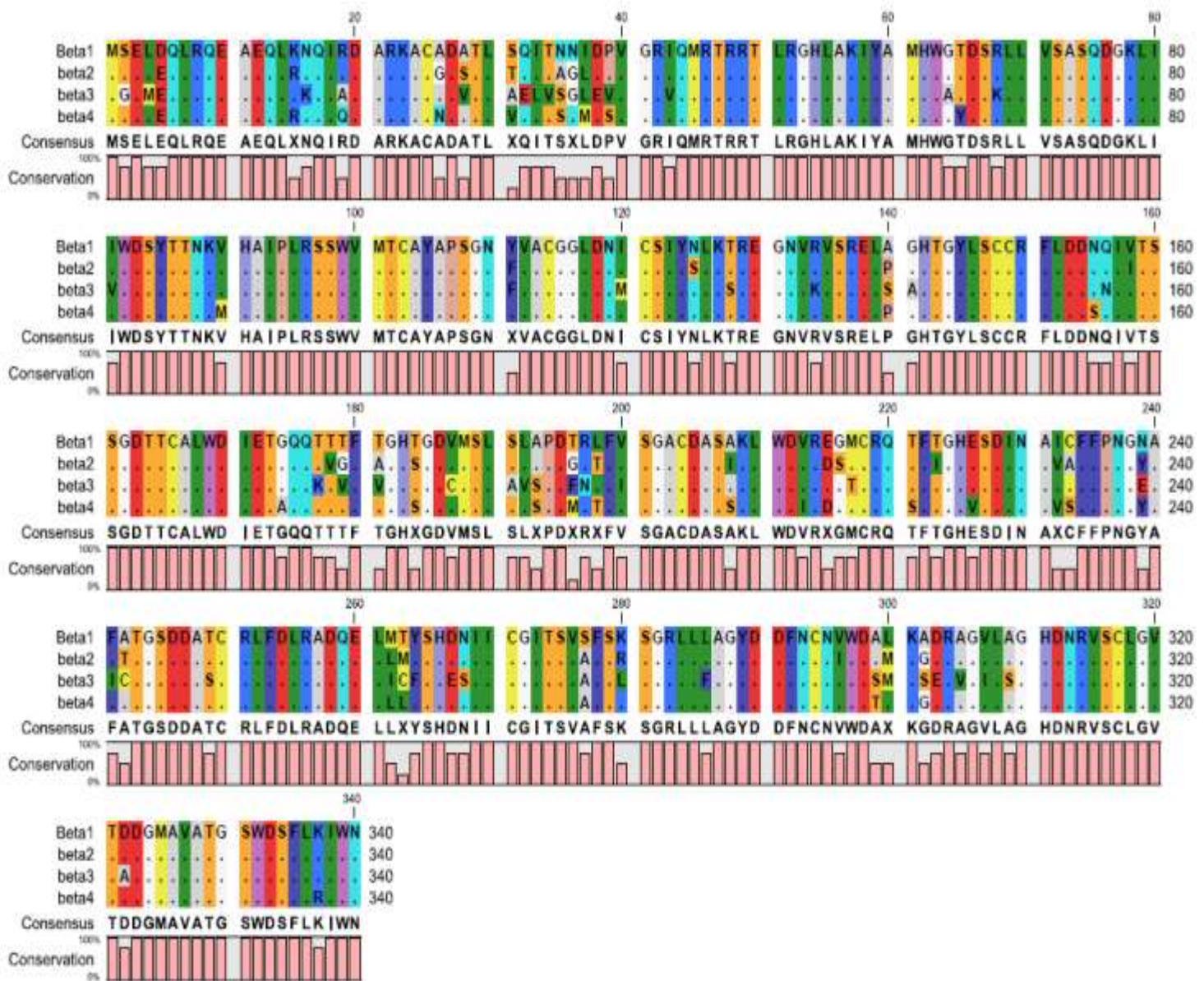
Desde el punto de vista estructural las subunidades β poseen una estructura secundaria conformada por siete hojas β plegadas denominadas también β propelas, dicha estructura se caracteriza por poseer un extremo N-Terminal que adopta una estructura secundaria de α hélice que es crucial para la interacción y la estabilidad del dímero $\beta\gamma$, denominado motivo similar a gamma o “gamma-like” (31). Estructuralmente, las hélices β_3 y β_4 y su lazo de unión son los motivos implicados en la interacción del dímero $\beta\gamma$ con sus respectivos efectores. Es bien conocido que la subunidad α -GTP interactúa con la β a través de su extremo N-Terminal haciendo un contacto extensivo entre ambas (32).

En relación con la estructura primaria de la subunidad β , se han encontrado que los 5 tipos hasta ahora descritos son similares. En este sentido, las subunidades β_1 - β_4 poseen dominios conservados en un 80% (**Esquema 2**) mientras que la subunidad β_5 solo presenta un 50 % de homología, siendo todas las subunidades β con la excepción de β_5 , capaces de interactuar de forma estable con las subunidades γ ; esta propiedad de β_5 constituye un mecanismo molecular desconocido, el cual está asociado a la fototransducción (44-45).

Las subunidades γ , son proteínas de bajo peso molecular que poseen entre 68-75 aminoácidos. Estas proteínas se caracterizan por tener dos α -hélices unidas por un lazo. La hélice del extremo N-terminal de las subunidades γ interactúa con la hélice N-terminal de la subunidad β . Las subunidades γ están firmemente asociadas

a la monocapa interna de la membrana plasmática mediante modificaciones del tipo farnesilación, doble geranililización y carboximetilación que se generan mediante enlaces tioésteres, con cisteínas de los extremos C-Terminal de estas subunidades (31). Las modificaciones lipídicas postranscripcionales de las subunidades $G\alpha$ y $G\gamma$ definen el tráfico de las proteínas G a través de las vesículas intracelulares, tal hecho constituye un mecanismo regulatorio de la interacción de las proteínas G con los receptores ya que la internalización o exposición de estos últimos, está íntimamente ligada a la actividad biológica de un receptor acoplado a proteínas G, el cual puede aumentarse por la interacción ligando-receptor hasta cinco veces sobre el nivel basal (32).

Por otra parte, las subunidades β y las subunidades γ forman una unidad funcional denominada dímero $\beta\gamma$ que no es dissociable (solo por desnaturalización) (38,41). Finalmente, se conoce que existen más de 60 posibles combinaciones de dímeros $\beta\gamma$ que, aunque poseen un altísimo grado de homología en el “Switch 2” (dominio de interacción con la subunidad α), no forman heterotrímeros estables con los diferentes subtipos de subunidades α (45). Adicionalmente, cada subunidad es codificada por un gen específico y poseen una localización específica y efectores específicos como se puede observar en la **Tabla 2**. Por otra parte, aunque casi todas las combinaciones de dímeros $\beta\gamma$ se pueden constituir *in vitro* (43,46) no todas esas combinaciones existen en la naturaleza, en este particular se han descrito principalmente los dímeros que se forman de las interacciones entre la subunidades β y γ como se muestra la **Tabla 3**.



Esquema 2. Alineación de las subunidades $\beta 1$ – $\beta 4$. Esquema que muestra la alineación de las subunidades $\beta 1$ – $\beta 4$ tomando como referencia a la subunidad $\beta 1$. (el punto en $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ indica que el aminoácido es igual al de la subunidad $\beta 1$).

Tabla 2. Genes, localización y efectores de las subunidades β y γ (31)

Subunidad	Gen	Expresión	Efectores
$\beta 1$	GNB1	En todos los tejidos	AC tipo I ↓
$\beta 2$	GNB2	En todos los tejidos	AC tipos II, IV, VII 1 ↑
$\beta 3$	GNB3	Retina y Olfato	PLC β ($\beta 3 > \beta 2 > \beta 1$) ↑ GIRK1–4 (Kir3.1–3.4) ↑
$\beta 4$	GNB4	En todos los tejidos	(GRK 2, 3) ↑ PI-3-K, β y γ ↑
$\beta 5$	GNB5	Principalmente en cerebro	VDCC T (Cav3.2) ↓
$\gamma 1$	GNGT1	RETINA	
$\gamma 14$	GNGT1	RETINA	
$\gamma 2, \gamma 6$	GNG2	En todos los tejidos	
$\gamma 3$	GNG3	Cerebro y Sangre	
$\gamma 4$	GNG4	CEREBRO	
$\gamma 5$	GNG5	En todos los tejidos	
$\gamma 7$	GNG7	En todos los tejidos	
$\gamma 8, \gamma 9$	GNG8	REGION OLFATORIA	
$\gamma 10$	GNG10	En todos los tejidos	
$\gamma 11$	GNG11	En todos los tejidos	
$\gamma 12$	GNG12	En todos los tejidos	
$\gamma 13$	GNG13	CEREBRO	

Tabla 3. Interacciones entre las subunidades β y γ .	
Subunidad β	Subunidades γ
$\beta 1$	Todas las Subunidades γ (47-53)
$\beta 2$	Todas excepto $\gamma 1$ y $\gamma 11$ (47-53)
$\beta 3$	$\gamma 5$, $\gamma 8$ y $\gamma 12$ (47–53)
$\beta 4$	$\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 5$ y $\gamma 12$ (47–53)
$\beta 5$	$\gamma 2$, $\gamma 4$, y $\gamma 7$ (54–55)

1.6 GMPc y la señalización celular.

El GMPc fue descrito en fluidos biológicos en 1963; para ese momento ya se conocía el papel del AMPc como segundo mensajero intracelular, siendo los agonistas β -adrenérgicos responsables del incremento de los niveles intracelulares del AMPc y los agonistas muscarínicos, los responsables del incremento en los niveles del GMPc. Al ser los agonistas β adrenérgicos y muscarínicos dos sistemas antagónicos, se postuló la existencia de una doble señalización celular a través de un sistema fisiológico antagónico tipo Ying- Yang (56).

En el MLVA clásicamente, el AMPc se ha asociado a la relajación mientras que el GMPc participa tanto en la relajación como en la contracción muscular lisa por lo que, se ha postulado la existencia de dos compartimientos de GMPc funcionalmente diferentes, así:

1. Un compartimiento, sensible a un grupo de sustancias que incluyen a los agonistas muscarínicos e histamina que incrementan los niveles de GMPc intracelular y que están asociados a la contracción muscular lisa (57).
2. Otro compartimiento regulado por nitrocompuestos y péptidos natriuréticos, los cuales provocan la relajación del músculo liso, asociada con un incremento en los niveles intracelulares de GMPc. (58)

A nivel celular, el GMPc es producido a partir del GTP por la acción de dos tipos de Guanililciclase: 1) Guanililciclase Particulada (pGC) y 2) La Guanililciclase Soluble (sGC) (59).

Las Guanililciclasas particuladas son desde el punto de vista estructural homodímeros que poseen dos sitios catalíticos los cuales deben estar dimerizados para sintetizar GMPc a partir de GTP.

Estas enzimas comparten características altamente conservadas entre todas las isoformas de Guanililciclasas particuladas. Dichas estructuras constan de:

- Dominio extracelular de Unión a Ligandos

- Dominio Transmembrana
- Región Homóloga al Sitio Catalítico de Proteínas Quinasas
- Dominio Catalítico (situado en la región C-terminal)
- Dominio Yuxtamembrana: Región corta de aproximadamente 25 aminoácidos, situado en la parte distal del dominio transmembrana, en la región citoplasmática de la proteína, que se ha postulada como el sitio de unión de Proteínas G (59) (**Figura 9**).

En vertebrados las Guanililciclasas particuladas pueden clasificarse en tres grupos principales:

1. Las pGC sensibles a la enterotoxina, estable al calor, producida por *E coli* (ST-a) y a las hormonas Guanilina y Uroguanilina (conocida como GC-C)
2. Las pGCs (D,E,F) de las cuales no se conocen agentes farmacológicos capaces de activarlas desde el medio extracelular (receptores huérfanos), estas suelen ser activadas intracelularmente y se encuentran asociadas a sistemas sensoriales (60-61).
3. Las Guanililciclasas sensibles a péptidos natriuréticos (NPR-GCs) que a su vez se clasifican de acuerdo con el péptido natriurético activador como se observa en la **Tabla 4** (60-61).

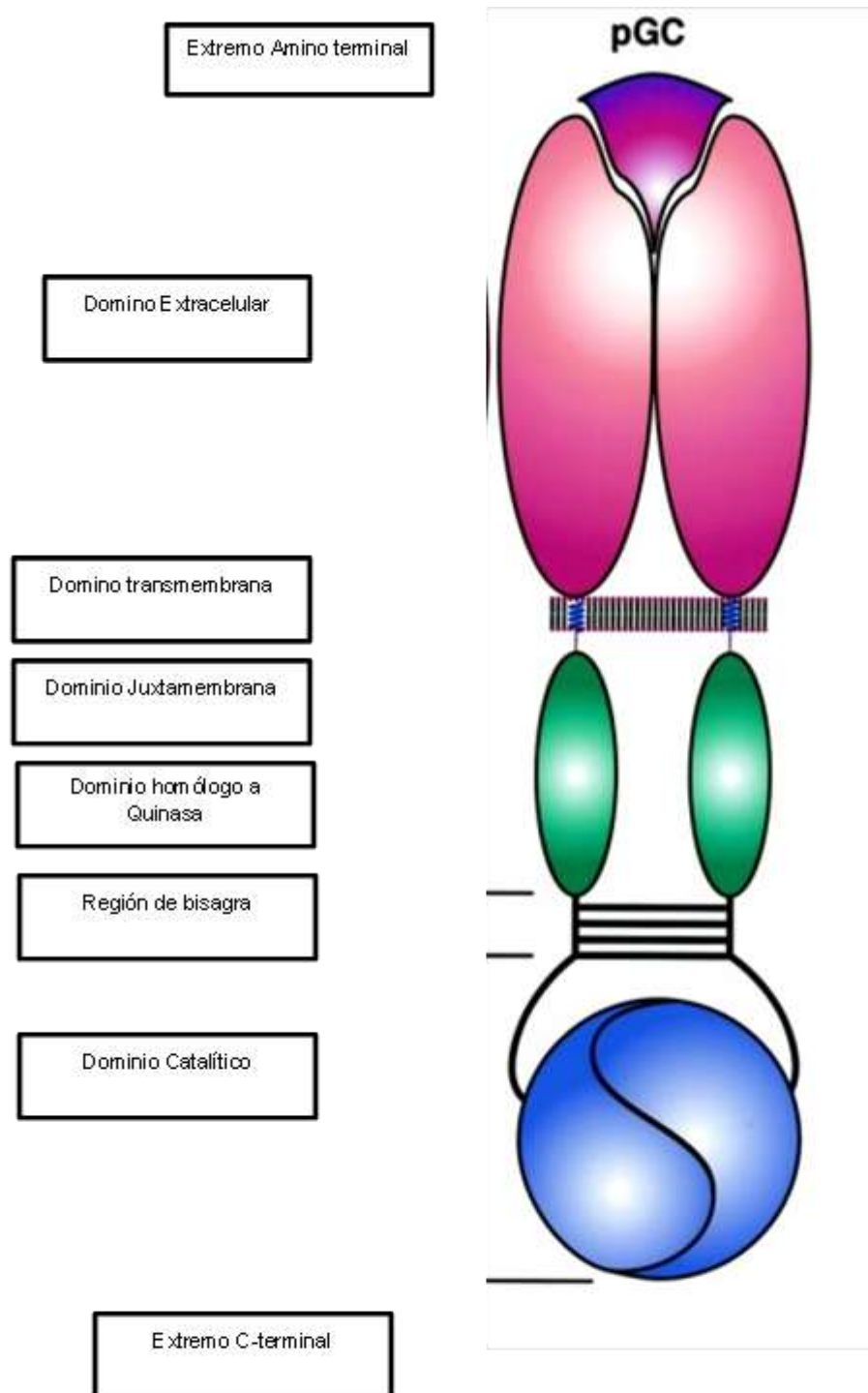


Figura 9. Modelo propuesto para la estructura de la Guanililciclase Particulada (59).

Tabla 4. Guanililciclasas Sensibles a Péptidos Natriuréticos (59).	
Tipo de Guanililciclaza	Péptido Natriurético
NPR-GC-A	ANP ≥ BNP >> CNP,
NPR-GC-B	CNP >> ANP ≥ BNP

En el MLTB se ha demostrado la existencia de las NPR-GC tipo A y B, las cuales son activadas por ANP o CNP, respectivamente; siendo la pGC-B las que poseen mayor actividad enzimática (62-63). Sin embargo, independientemente del activador, ambos ligandos relajan el MLTB; además en el MLVA se ha descrito una vía de señalización celular, en la cual las Guanililciclasas Particuladas del tipo NPR-GC presentes en las membrana plasmáticas del MLVA se encuentran reguladas recíprocamente por dos subtipos de receptores muscarínicos: m_3 AChRs y m_2 AChRs, los cuales se encuentran acoplados a sus correspondientes proteínas G y han sido designadas como G_{q16} y G_i , que se encargan de mediar la activación (proteína G_{q16}) e inhibición (un subtipo de proteína $G_{i/o}$ que aún se desconoce) de la NPR-GC (64) (**Figura 10**).

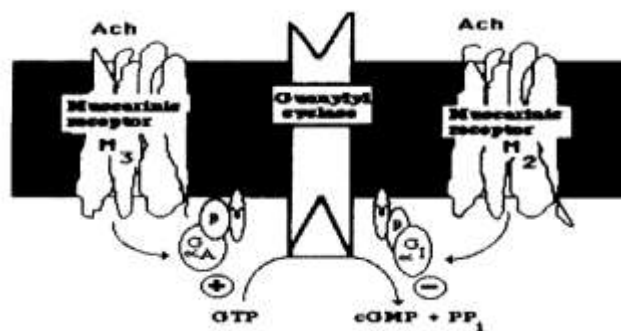


Figura 10. Modelo de regulación dual de la NP-GC mediante receptores muscarínicos (64).

Por otra parte, las Guanililciclasas Solubles (sGC) se encuentran en el citoplasma de casi todas las células de mamífero y median un amplio rango de importantes funciones fisiológicas, tales como la inhibición de la agregación plaquetaria, la relajación del músculo liso, la vasodilatación, la transducción de señales a nivel neuronal y la inmunomodulación (65-69).

Desde el punto de vista estructural las sGC son un heterodímero que posee un grupo hemo unido a dos subunidades α y β . La subunidad β tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa, mientras que la subunidad α posee un peso molecular entre 73-82 kDa. Cada subunidad tiene un dominio regulatorio N-Terminal y un dominio catalítico C-terminal, el cual posee un alto grado de homología con el correspondiente dominio de la Guanililciclasas particuladas (**Figura 11**). Ambas unidades poseen dos isoformas a saber α_1 , α_2 , β_1 y β_2 (70) siendo el dímero $\alpha_1\beta_1$ el más ubicuo (71) y el que se expresa en MLTB (72). Estas sGC requieren al Mn^{+2} y al Mg^{+2} como cofactores para expresar su máxima actividad catalítica (65-69).

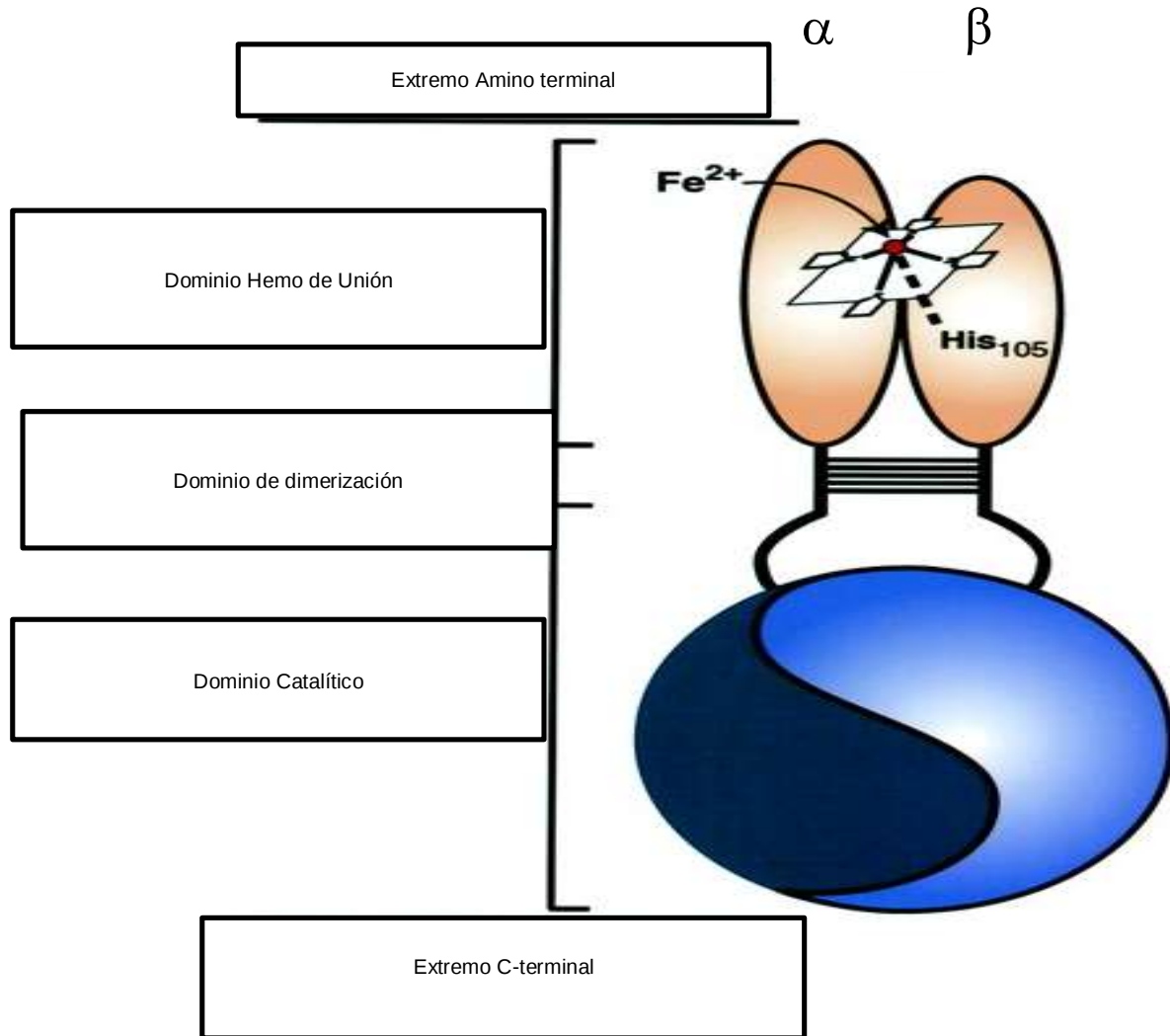


Figura 11. Estructura de la Guanililciclase Soluble (59).

Las Guanililciclases solubles se transforman en un complejo ferroso-nitrosil-hemo, la formación de este complejo conduce al rompimiento de un enlace entre el grupo imidazol axial y el hierro del grupo hemo, lo que provoca un cambio conformacional en la estructura de la proteína, lo que crea una estructura semejante a la protoporfirina IX (PPIX), la cual es la estructura crucial para la

activación de esta enzima (59); dicha estructura (PIPX) es interferida por el ODQ (1*H*-[1,2,4]oxadi azolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one) que actúa como inhibidor de la sGC y es usado para demostrar las cascadas de señalización celular en las que participa esta enzima (65-69).

Es importante recalcar que los activadores directos de las NPR-GCs y las sGCs, a saber, péptidos natriuréticos y donadores de NO, generan cascadas de señalización que conducen a la relajación del MLVA. Por otra parte, cuando estas enzimas son activadas por receptores muscarínicos se encuentran asociadas a la contracción.

La relación existente entre la contracción del músculo MLTB y la activación de las Guanililciclasas quedó demostrada mediante experimentos realizados en MLTB intacto aislado en baño de órgano, en los que se evidenció que la administración del agonista muscarínico carbamilcolina (CC) era capaz de producir una contracción dependiente de la concentración en un rango entre 10^{-9} - 10^{-4} M (**Figura 12**) tal contracción ocurre durante los primeros 90 s después de añadida la carbamilcolina, período de tiempo en el cual se ha descrito la aparición de incrementos en los niveles intracelulares de GMPc en forma de señales transitorias (picos). Estos picos de GMPc ocurren a los 20 y 60 s después de la adición de carbamilcolina como lo muestra la **Figura 13** en la cual podemos visualizar que la concentración de GMPc d e la primera señal es aproximadamente el doble con respecto a la segunda (73).

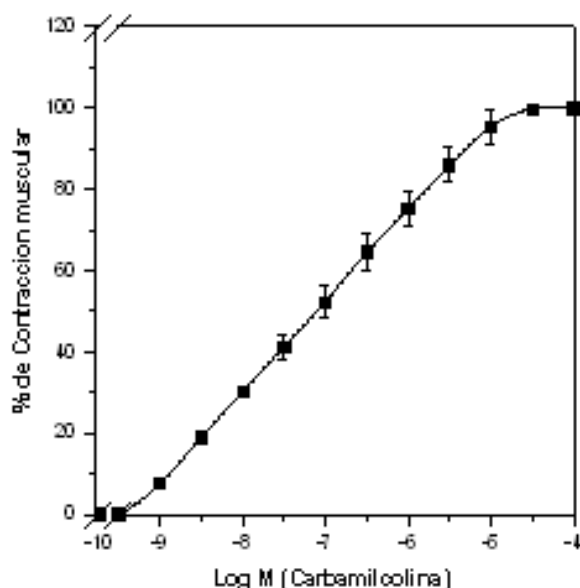


Figura 12. Efecto de la concentración de carbamilcolina sobre la actividad contráctil del MLTB. La máxima actividad contráctil es considerada 100 % ($3,2 \pm 0,2$ g). Cada valor corresponde a 5 franjas musculares de diferentes tráqueas $\pm$ el error estándar (73).

Por otra parte, los autores realizaron el mismo esquema experimental en presencia de un inhibidor específico de la sGC, ODQ el cual genera una inhibición selectiva de la primera señal de GMPc (20s) sin afectar la segunda, de lo cual se concluye, que la primera señal proviene de la activación de la sGC y la segunda proviene de la activación de las NPR-GCs (**Figura 13**) (73).

En estudios posteriores realizados en la Sección de Biomembranas del Instituto de Medicina Experimental de la UCV, se ha demostrado que el ODQ inhibe parcialmente la contracción del MLTB dependiendo de la concentración lo cual permite relacionar a la primera señal de GMPc con la contracción del MLTB. (**Figura 14**).

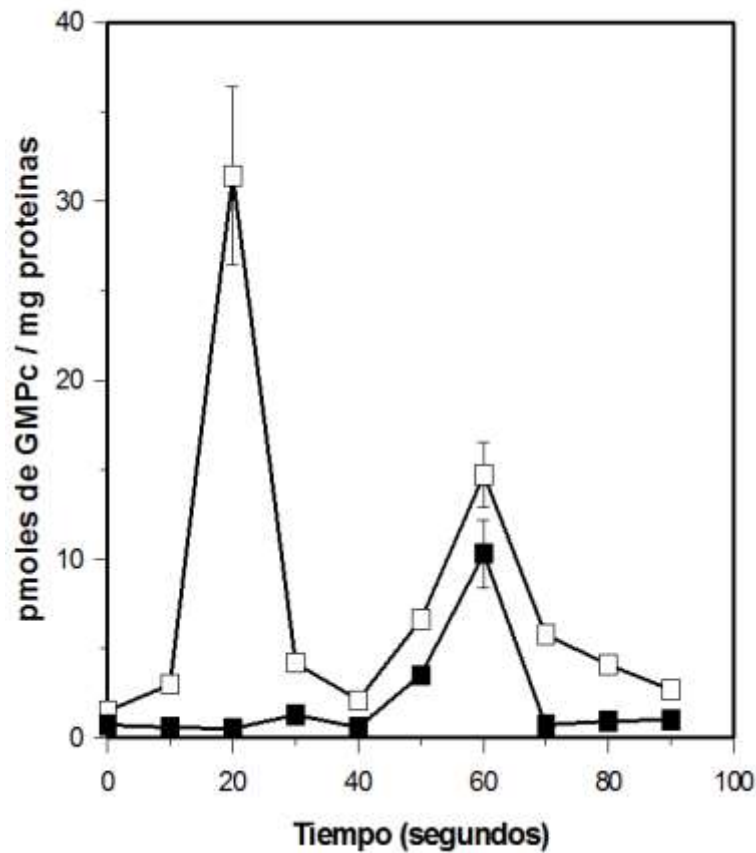


Figura 13. Efecto del ODQ en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB. Las franjas musculares son estabilizadas por 10 min en medio Krebs Ringer-bicarbonato (KRB) a 37 °C luego son pre-incubadas por 30 min con ODQ (■) (100 nM) y el “control” (sin ODQ) (□) posteriormente se agrega carbamilcolina $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y cada 10 s se retira una muestra de la cámara multiórgano y se congela en nitrógeno líquido para luego determinar el contenido de GMPc. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos $\pm$ el error estándar (73).

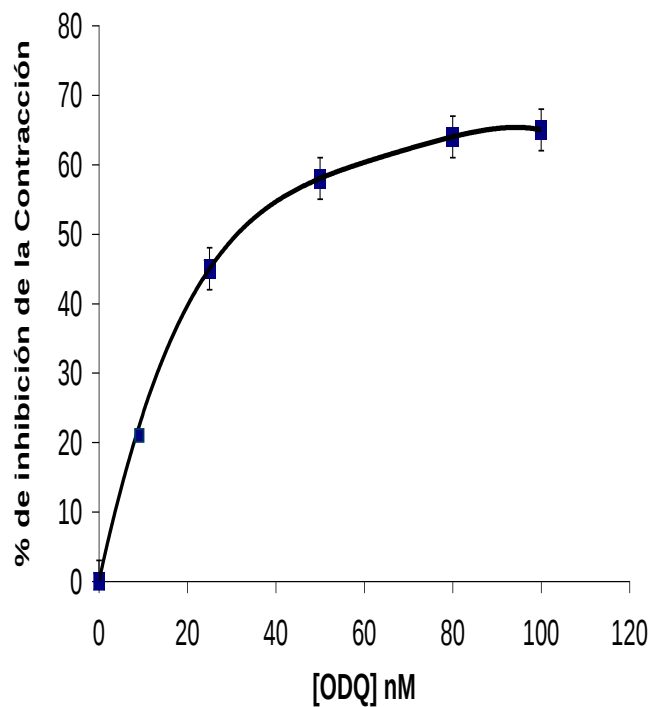


Figura 14. El efecto del ODQ sobre la actividad contráctil inducida por el agonista muscarínico carbamilcolina 10^{-5}M . Las franjas musculares fueron pre-incubadas con ODQ por 10 min y posteriormente se añadió carbamilcolina 10^{-5}M . La máxima actividad contráctil fue considerada 100 % sin ODQ ($1,8 \pm 0,2$ g). Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm \text{ES}$ de 3 franjas musculares de diferentes tráqueas.

Además de los estudios con el inhibidor de las sGC ODQ, estudios posteriores utilizaron técnicas farmacológicas que permiten estudiar la interacción de los receptores con las proteínas G por medio del uso de compuestos que pueden inactivar de forma permanente dichas proteínas, en este sentido como se señaló en la **Tabla 1** las subunidades α de la familia Gi/o poseen sitios que pueden ser modificados de manera covalente por la toxina de la *Bordetella pertussis* (PTX), la cual depende de ATP para su actividad.

Por otra parte las proteínas G heterotriméricas también pueden ser afectadas por compuestos activadores como el tetradecapéptido catiónico Mastoparán (75-76), el cual se encuentra presente en el veneno de las avispas de la especie *Vespula lewisii* (77). Este péptido estimula directamente a las subunidades α de las proteínas Gi/o sensibles a PTX, incrementando la unión de GTP y la actividad GTPasa de estos subtipos de proteínas G (78-79).

El Mastoparán pertenece a una familia de péptidos catiónicos que fue descrita originalmente por Hirai y col. en 1979 (77) y ha sido identificada como el principio activo degranulador de mastocitos del veneno de la especie *Vespula lewisii*, este se caracteriza por:

1. No formar Puentes disulfuro.
2. Formar α hélices.
3. Poseer un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos.
4. intercalar tres lisinas en su estructura primaria: estos residuos de aminoácidos cargados positivamente modulan la capacidad de inserción de Mastoparán a las membranas plasmáticas. Por lo cual a mayor número de lisinas menor capacidad de inserción y por tanto menor actividad desacoplante de proteínas Gi/o, en este sentido se han descrito dos análogos de Mastoparán a saber:
 - Mastoparán 17 que posee 4 lisinas y por ende posee menor capacidad de inserción a membrana lo que lo hace menos activo que Mastoparán.
 - Mastoparán 7 que posee dos lisinas y es menos catiónico que el Mastoparán, lo que mejora la inserción a membranas y por tanto es más activo que Mastoparán (**Tabla 5**) (80-81).

Tabla 5. Estructura Primaria del Mastoparén y de sus Análogos Mastoparén 7 y Mastoparén 17.

Mastoparén 17	INLKAKAALAKKLL-NH ₂
Mastoparén	INLKALAALAKKIL-NH ₂
Mastoparén 7	INLKALAALAKALL-NH ₂

En dicha familia de péptidos catiónicos también se encuentran las Neuroquinina, Sustancia P y el Compuesto poliaminado 48/80 que al igual que el Mastoparén se caracterizan por activar las Proteínas G heterotriméricas como las Proteínas Gi/o , aunque en menor grado. Estos efectos se evitan en la mayoría de los casos si las proteínas G modificadas son tratadas con PTX o con anticuerpos contra las subunidades Gi/o (80-81).

Cuando se utilizó el modelo experimental anteriormente descrito en presencia de Mastoparén a la concentración de 50 nM, **(Figura 15)** se observó una inhibición de las dos señales de GMPc tanto a los 20 s en un 57% (inhibición parcial) como a los 60 s en su totalidad lo cual al igual que con el ODQ está estrechamente vinculado con una inhibición del efecto contráctil inducido por carbamilcolina sobre el MLTB **(Figura 16)**. En esta condición el Mastoparén inhibe totalmente la contracción del MLTB a una concentración de 50 nM, este efecto inhibitorio fue estudiado a diferentes concentraciones y se observó que el Mastoparén fue capaz de reducir la respuesta máxima sin afectar la DE₅₀ de carbamilcolina lo que nos permite considerar al Mastoparén como un inhibidor del tipo no competitivo de la contracción inducida por carbamilcolina. (82) **(Figura 16)**.

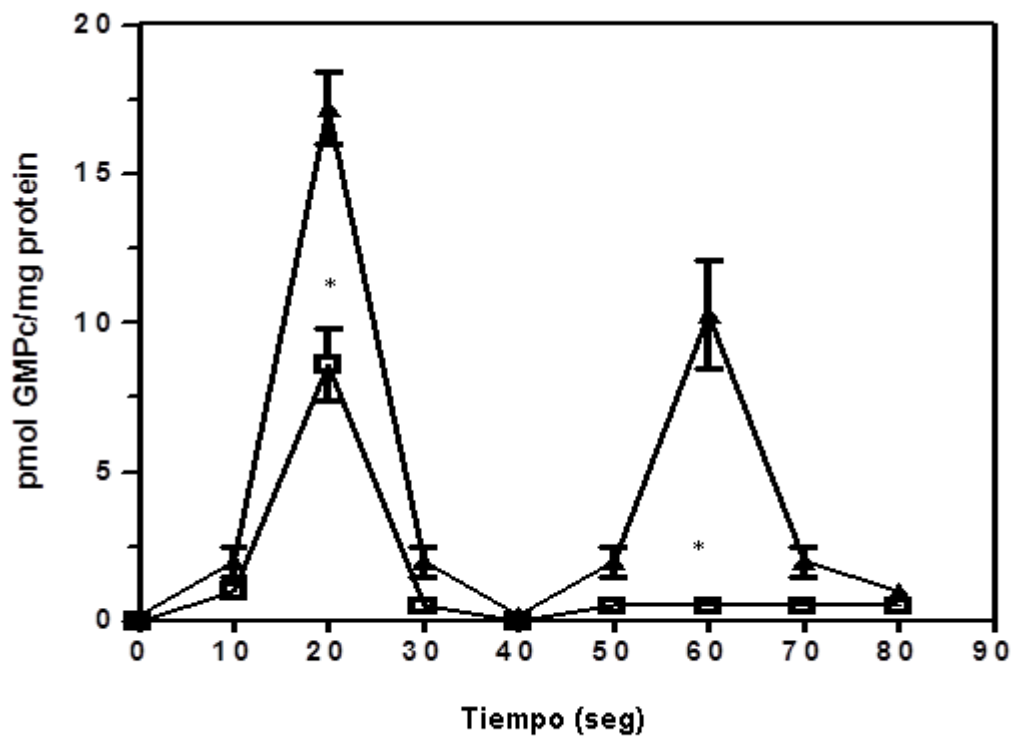


Figura 15. Efecto del Mastoparén en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB. Las franjas musculares son estabilizadas por 10 min en medio KRB a 37 °C luego son pre-incubadas con Mastoparén (50 nM) (□) y el “control” (■) sin Mastoparén posteriormente se agrega carbamilcolina $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y cada 10 s se retira una muestra de la cámara multiórgano y se congela en nitrógeno líquido para luego determinar el contenido de GMPc. Cada punto representa el promedio de 3 experimentos $\pm$ el ES (* $p < 0,05$) (82).

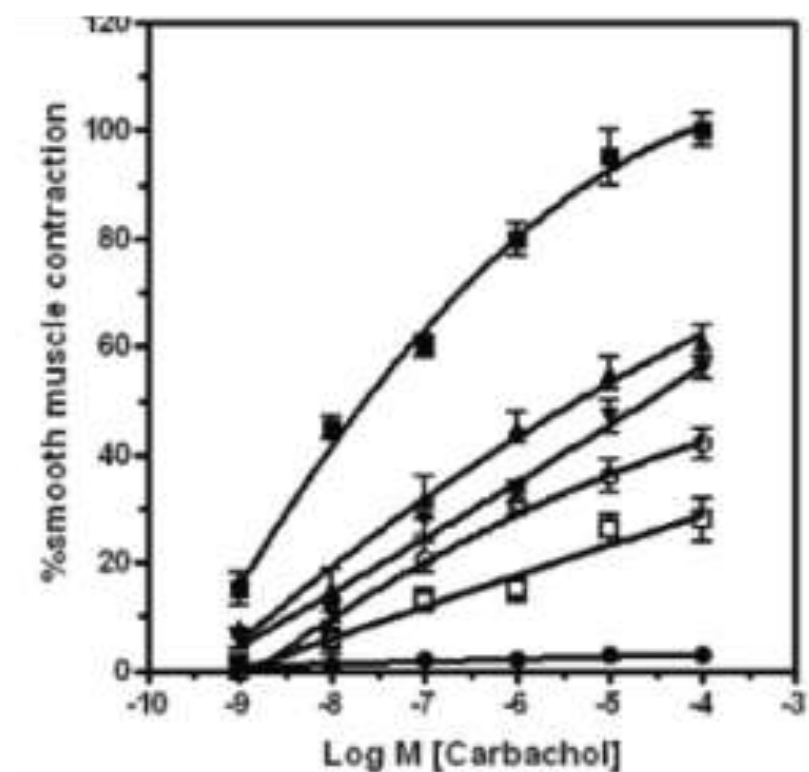


Figura 16. Curva dosis-respuesta de la contracción del músculo liso traqueal de bovino con carbamilcolina a diferentes concentraciones de Mastoparén. Las franjas musculares fueron pre-incubadas por 10 min con diferentes concentraciones de Mastoparén, y sin Mastoparén (control) posteriormente se añade carbamilcolina $10^{-5}M$. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm ES$ de 3 franjas musculares de diferentes tráqueas. $^{*}(p < 0,05)$ (25). Control ■; 2,5nM ▲; 5 nM ▼; 10nM ○; 25nM □; 50nM ● (82).

Estos experimentos ponen de manifiesto que:

1. El Agonista muscarínico carbamilcolina a pesar de no atravesar la membrana plasmática puede activar a una enzima citosólica como la sGC.
2. El Mastoparén que es un péptido catiónico formador de α -hélices que no atraviesa la membrana plasmática, logra inhibir en casi un 60% la señal de sGC.

En este sentido, Uray y col. demostraron el origen bioquímico de la cascada asociada a la señal de 20 s (72) dichos autores realizaron experimentos con franjas de MLTB intactas las cuales fueron expuestas por 70 s al agonista muscarínico carbamilcolina [1×10^{-5} M], durante este periodo de tiempo se removía una franja cada 10s, de las cuales se obtuvo un extracto crudo de membrana. En estas membranas se evaluó la actividad GC en presencia de 3mM $MnCl_2$, 0,2M GTP, 5mM creatina fosfato, y 10 IU fosfocreatina quinasa en 0,01% de BSA, en las siguientes condiciones a saber: basal, en presencia de carbamilcolina, en presencia de SNP y con Carbamilcolina + SNP (**Figura 17**).

Esos experimentos demostraron:

1. Un aumento de la actividad GC a los 20 s y 60 s en membranas activadas con carbamilcolina.
2. La actividad GC en membranas activadas con carbamilcolina se incrementa a los 20 s en presencia de SNP mientras que la señal a 60s es insensible al SNP.

Debido al aumento significativo de la actividad sGC a los 20 s con CC+ SNP los autores realizaron, en esta condición, inmunoblots con anticuerpos específicos contra las subunidades α -sGC y β -sGC, en este sentido sometieron, membranas pre-incubadas con carbamilcolina y membranas control, a electroforesis en gel de SDS-PAGE al 12% el cual fue transferido a membranas de nitrocelulosa y expuesto a anticuerpos policlonales específicos contra la subunidad $\alpha 1$ -sGC, $\alpha 2$ -sGC, $\beta 1$ -sGC o $\beta 2$ -sGC, observándose una banda que migró con un peso molecular de 72 kDa, a 0, 20 y 60 s con anticuerpos $\alpha 1$ -sGC, después de la exposición a carbamilcolina (**Figura 18 A**), y una banda que

migró con un peso molecular de 65 kDa con anticuerpos $\beta 1$ -sGC, a los 20 s después de la exposición a carbamilcolina (**Figura 18 B**).

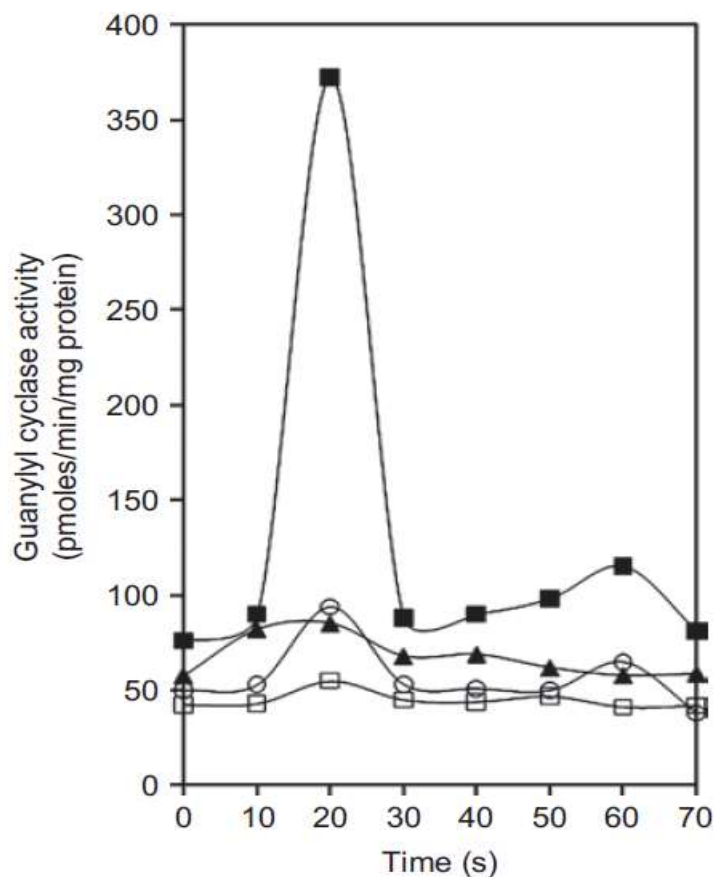


Figura 17. Actividad Guanililciclase estimulada por carbamilcolina [1×10^{-5} M] en el tiempo. La actividad GC fue medida en cada extracto crudo de fracciones de membrana plasmática de MLTB. □ Basal ○ CC [1×10^{-5} M] ▲ SNP ■ CC + SNP. Cada Valor corresponde al promedio de 3 franjas distintas de MLTB (72).

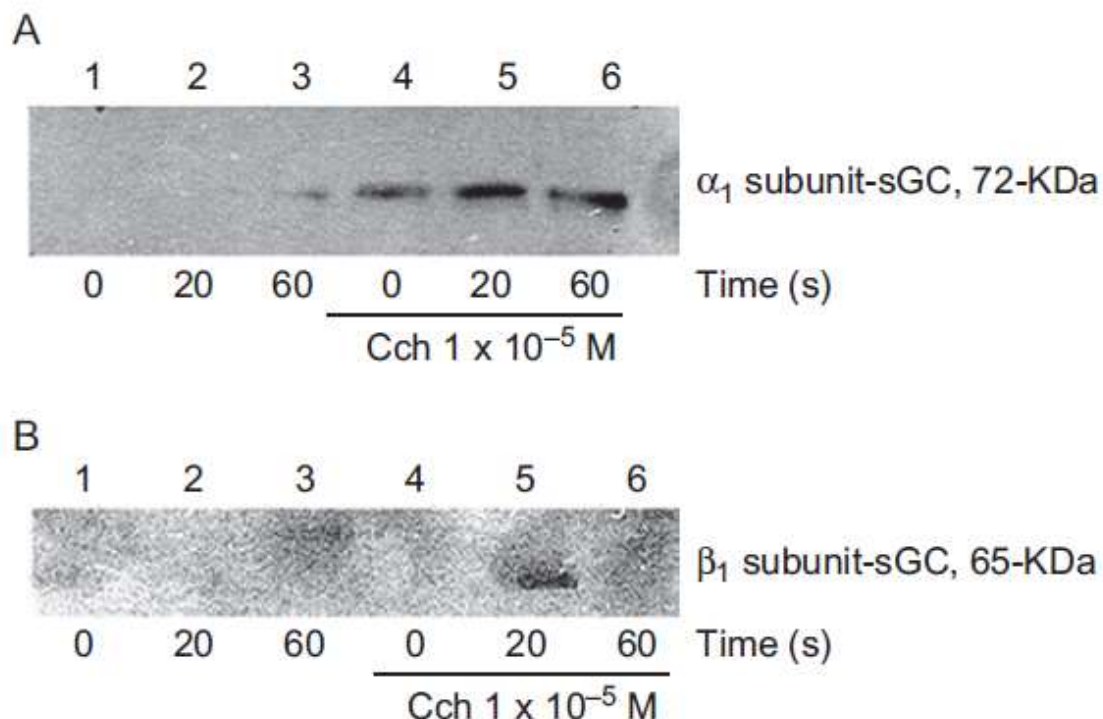


Figura 18. Identificación por Western blot de las subunidades α_1 y β_1 de la sGC en extracto crudo activado con carbamilcolina (72).

Tomando en cuenta:

- Que el m2AChR tiende a hacerse disfuncional y que la pérdida de función del m2AChR por mecanismos diversos ocasiona broncoconstricción.
- Que el Mastoparán es un inhibidor no competitivo de la contracción del MLTB y a su vez inhibe las dos señales de GMPc que provienen de las sGC y las NPR-GC-B.
- Que el mecanismo de acción descrito para Mastoparán es mediado por activación de proteínas Gi/o.

En el presente trabajo de investigación nos propusimos identificar las proteínas Gi/o asociadas al m2AChR, relacionadas con la inhibición de las señales colinérgicas de GMPc (20s y 60s) inducida por Mastoparán, como posible mecanismo novedoso capaz de activar las proteínas Gi/o sin pasar por la activación del m2AChR.

II Objetivos

2.1 Objetivo General.

Identificar a las proteínas G heterotriméricas de la subfamilia Gi/o sensibles a Mastoparén y asociadas al m2AChR, que intervienen en la inhibición de la NPR-GC-B y la sGC en el MLTB.

2.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de concentraciones crecientes de Mastoparén sobre los niveles de GMPc inducidos por la activación colinérgica del MLTB.
2. Determinar el efecto de la PTX sobre las señales del GMPc y la contracción inducida por carbamilcolina en el MLTB en presencia y ausencia de Mastoparén.
3. Evaluar el efecto de los péptidos carboxilo terminal de las subunidades alfa de las proteínas Gi/o sobre la actividad NPR-GC-B y sGC en fracciones de membrana de MLTB.
4. Evaluar el efecto de anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad muscarínica de las NPR-GC-B y sGC en fracciones de membrana de MLTB cuyos receptores m3AChR han sido inactivados.
5. Evaluar el efecto de anticuerpos anti- α Gi/o y anti- β sobre la actividad de las NPR-GC-B y sGC en fracciones de membrana de MLTB expuestas a Mastoparén, cuyos receptores m3AChR han sido inactivados.

III Materiales y Métodos

3.1 Material biológico

Se utilizó un modelo experimental *ex vivo* de tráqueas de bovino (*Bos taurus*). Las tráqueas se obtuvieron de animales sanos certificados y recién beneficiados en el matadero local (Matadero Caracas), las cuales fueron trasladadas al laboratorio en condiciones refrigeradas a 5°C y mantenidas en solución de Krebs Ringer-bicarbonato (KRB). La composición de este amortiguador en mM es: NaCl 118,5; KCl 4,47; MgSO₄ 1,18; KH₂PO₄ 1,18, CaCl₂ 2,54; NaHCO₃ 24,9; Glucosa 10; pH: 7.4.

3.2 Reactivos:

Tabla 6. Reactivos utilizados discriminados por casa comercial.	
REACTIVOS	Casa Comercial®
Carbamilcolina, EDTA, Atropina, Glucosa, Mastoparén, Sacarosa, Tris, HCl, Ditioneitol (DTT), PMSF, Sacarosa, CNP-53, SNP, TCA, Tartrato de Na y K, DTT, PMSF, 4-Difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP) mustard, metoctramina, creatina fosfato, fosfocreatina quinasa, GTP.	Sigma

REACTIVOS	Casa Comercial®
NaCl, KCl, MgSO ₄ , KH ₂ PO ₄ , CaCl ₂ , H ₂ SO ₄ , Reactivo de Folín y Sulfato de Cobre.	Merck
NaHCO ₃ , TCA, HCL, Xileno	Fisher
Estuche de Biotrans Assay System para la determinación de GMPc	Amersham
Péptidos C terminal: α -Gi1-2: KNVQFVFDAVTDVIIKNNLKDCGLF α -Gi3: NVQFVFDAVTDVIIKNNLKECGLY α -Go1: NIQVVFDAVTDIIIANNLRGCGLY α -Go2: NIQFVFDAVTDVIIAKNLRGCGLY	Unidad de síntesis de Péptidos del Instituto de Medicina Tropical

Adicionalmente, se utilizaron una serie de anticuerpos policlonales de la casa Santa Cruz Biotechnology, Inc. En la **Tabla 7** se indican los epítopes (cuando la información fue provista por el fabricante). Los anticuerpos se probaron sobre los controles en diluciones seriadas, se usó la mínima dilución en la que se observó el mayor efecto inhibitorio (en el caso de G α i-1 o G α i-2 en los cuales no se observó actividad inhibitoria se utilizó la dilución de 1/50 la cual es 10 veces superior a las sugerida por el fabricante).

Tabla 7. Anticuerpos Epítopes y diluciones utilizadas para el bloqueo de las proteínas α -Gi/o, β , m2AChR y m3AChR.

Anticuerpos Santa Cruz Biotechnology	Dilución	Epítope
G α i-1	1:50	No indicado.
G α i-2	1:50	No indicado.
G α i-3	1:50	Dirigido contra los residuos 339-354.
G α o	1:50	Dirigido contra los residuos 161-170
G β 1	1:100	Dirigido contra los residuos 130-145
G β 4	1:50	Dirigido contra los residuos 197-225
Anti m ₃ AChRI ₃	1:50	Dirigido contra el asa intracelular I ₃
Anti m ₂ AChRI ₃	1:50	Dirigido contra el asa intracelular I ₃

3.3 Disección del músculo liso traqueal de bovino (MLTB).

Para disecar el MLTB se cortó la tráquea a nivel de su tercio superior. Una vez obtenida esta porción, se separaron los tejidos conectivo y epitelial del tejido muscular liso manteniéndose este último, unido al cartílago traqueal en forma de franjas musculares de aproximadamente 10 x 2 mm para preservar la tensión normal sobre el tejido muscular. Una vez disecado el tejido se colocó en solución KRB burbujeada con carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), a temperatura ambiente hasta su uso en un lapso no mayor de seis horas, con cambios periódicos de la solución amortiguadora, cada 30 min.

3.4 Actividad contráctil del MLTB.

La actividad contráctil del músculo liso se determinó en presencia de agonistas, e inhibidores, según sea el caso. Para evaluar la actividad contráctil, las franjas de MLTB de aproximadamente 10 x 2 mm fueron colocadas en un baño de órgano de 20 ml de capacidad, en el cual el tejido fue conectado a un sistema Transductor de fuerza y desplazamiento FT03 (Grass Instrument-modelo FT03) el cual a su vez se encontraba acoplado a un polígrafo (Grass Instrument® polygraph M7B), el tejido es calibrado a una relación de 1 cm/g de tensión y sumergido en solución KRB a 37 °C, burbujeadas con carbógeno (23). Los resultados fueron expresados como porcentaje de la contracción muscular en función del control (valores promedios $\pm$ DS de $n \geq 3$). Estas preparaciones fueron desarrolladas siguiendo la secuencia de adición de reactivos que se muestra en el **Esquema 3 (Figura 19)**.

Control		200 min	
Periodo de Estabilización (PE) 		CC 10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵ M 	
PTX 200 ng/ml		200 min	
20 min			
PE 	PTX 200 ng/ml 	CC 10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵ M	
Mastoparán 50 nM (MP) 			
		190min	200 min
Periodo de Estabilización (PE) 		MP	CC 10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵ M
PTX 200 ng/ml + Mastoparán 50 nM (MP) 			
10min.		190 min	200 min
PE 	PTX 200 ng/ml 	MP	CC 10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁵ M

Esquema 3. Secuencia de adición de reactivos durante la contracción del MLTB. El músculo se estabiliza en 10 min; sin embargo, la carbamilcolina se añadió a los 200 min para que todos los músculos posean el mismo tiempo de incubación previo a la contracción.

3.5 Tratamiento del tejido muscular para la extracción de los nucleótidos.

Para realizar la extracción de nucleótidos cíclicos las franjas de MLTB fueron colocadas en una cámara de incubación de 400 ml y con una tensión de 1 g, en condiciones óptimas de aireación (95% O₂ y 5% CO₂) y temperatura a 37°C. Al finalizar la incubación, las muestras fueron removidas y congeladas con nitrógeno líquido para detener la reacción; posteriormente se homogenizaron en 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 6 % a 4°C. La suspensión obtenida se centrifugó a 1.000 g y 4°C por 15 min y se separó el sobrenadante del precipitado; posteriormente se procedió a una re-extracción del precipitado bajo las condiciones arriba descritas. El precipitado obtenido fue disuelto en NaOH 4 N para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Lowry modificado por Bensadoun y Weinstein (83-84). El sobrenadante es tratado para remover el TCA mediante el proceso de extracción con éter dietílico saturado en agua (dos veces) para posteriormente liofilizar la fase acuosa, la cual una vez finalizado este proceso es resuspendida en 1 ml de Tris-EDTA, pH 7,4. La determinación de GMPc en el extracto ácido soluble fue cuantificada por radioinmunoensayo para lo que fueron utilizados los Estuches comerciales de la casa Amersham. El fundamento de la determinación del GMPc está basado en la competencia entre el GMPc no marcado y el [³H]-GMPc por la unión a un anticuerpo que posee una alta especificidad por el GMPc. Por lo tanto, la radioactividad es inversamente proporcional a la cantidad de GMPc. Se presentarán los resultados en pg de GMPc por mg de proteínas (valores promedios ± DS, de n≥3) Estas preparaciones fueron desarrolladas siguiendo la secuencia de adición de reactivos que se muestra en el **Esquema 4 (Figura 19)**.

Control			200 min
Período de Estabilización (PE)			CC 10 ⁻⁵ M o CNP-53 10 ⁻⁷ M o SNP 50μM
PTX+CC			
20 min		200 min	
PE	PTX 200 ng/ml	CC 10 ⁻⁵ M	
MP + CC o CNP o SNP			
		190 min	200 min
Periodo de Estabilización (PE)		MP	CC 10 ⁻⁵ M o CNP-53 10 ⁻⁷ M o SNP 50μM
PTX+MP+ CC o CNP o SNP			
10min		190min	200min
PE	PTX 200 ng/ml	MP	CC 10 ⁻⁵ M o CNP-53 10 ⁻⁷ M o SNP 50μM

Esquema 4. Secuencia de adición de reactivos durante la activación muscarínica del MLTB. El músculo se estabiliza en 10 min; sin embargo, la carbamilcolina el SNP o el CNP-53 se añadieron a los 200 min para que todos los músculos posean el mismo tiempo de incubación previo a la activación.

Metodología

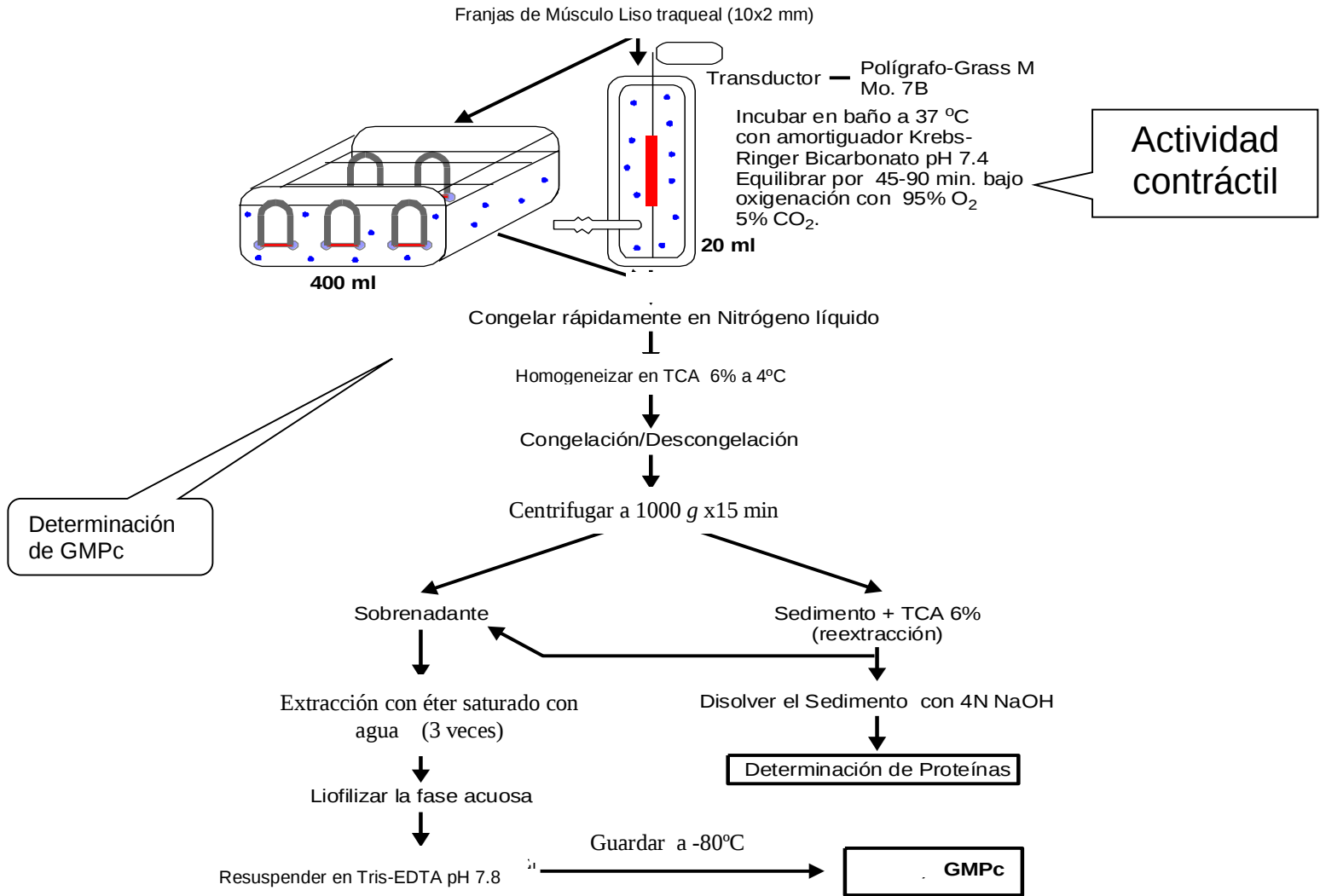


Figura 19. Sinopsis Metodológica.

3.6 Fraccionamiento subcelular del músculo liso traqueal de bovino.

Las fracciones subcelulares de MLTB fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Lippo de Bécemberg y col. (85-86). Se utilizaron alrededor de 10 tráqueas de bovino, las cuales fueron trasladadas al laboratorio siguiendo el protocolo descrito previamente.

Las tráqueas se cortaron en la parte superior, para remover el tejido cartilaginoso, la serosa y la mucosa, con el fin de exponer las franjas de MLTB. Una vez expuesto, fue extraído del cartílago y pesado, (generalmente se obtienen de 200-250 g de tejido), posteriormente se cortó con tijeras y se lavó con una solución amortiguadora ISP (Sacarosa 0,3 M; Tris-HCl 20 mM pH 7,2; DTT 0,5 mM; PMSF 0,25mM). El MLTB se disgregó dos veces en 1ml de amortiguador ISP/g de tejido con una licuadora Oster a máxima velocidad por 30 s y con intervalos de 1 min de reposo en hielo. El material dispersado se centrifuga a 850 g x 10 min (En rotor HV4 Sorvall), y el sobrenadante, denominado E₁, es separado del sedimento y filtrado a través de una gasa doble.

El sedimento es nuevamente resuspendido en un Amortiguador ISP a la misma proporción y se procede a homogeneizar y centrifugar como se describió anteriormente para obtener el sobrenadante E₂. El sedimento se resuspendió con solución amortiguadora ISP (1ml/g) y se filtró secuencialmente a través de 2, 4 y 8 capas de estopillas de algodón (gasa), con el fin de extraer completamente el líquido contenido en la preparación. El material retenido en la gasa fue descartado. El filtrado se centrifugó a 1.000 g x 10 min y se obtuvo un sedimento que constituyó la fracción nuclear. El sobrenadante obtenido E₃ se combina con E₁ y E₂. Este extracto combinado es referido como fracción E o extracto celular. La fracción E se centrifugó a 3.1000 g x 1 min y el sedimento obtenido se resuspendió en la solución amortiguadora ISP (1ml/g) lo cual constituyó la fracción mitocondrial. El sobrenadante postmitocondrial se centrifugó a 150.000 g x 60 min y el sedimento que constituye la fracción microsomal P se resuspendió en una solución ISP (0,3 M sacarosa). La fracción P se sometió a un fraccionamiento en gradiente discontinuo de sacarosa (Tope: 0,3 M; Centro 0,82 M; fondo 1,28 M) y se centrifugó en un rotor Beckman SW28 a 80.000 g x 60 min. En este gradiente se obtienen tres fracciones

P₁ (en la interfase entre 0,3M y 0,82 M) P₂ (en la interfase entre 0,82 y 1,28 M) y P₃ (en el fondo). Las fracciones P₁ y P₂ se colectan y se diluyen 1:1 con una solución amortiguadora ISP, sin sacarosa y se centrifugan a 150.000 *g* x 30 min. Los sedimentos obtenidos por este procedimiento se resuspendieron en alrededor de 10 ml de una solución amortiguadora ISP (Sacarosa 0,3M, Tris-HCl 20 mM pH 7,2 y DTT 0,5 mM). Estas fracciones se dividen en pequeñas alícuotas de 0,5 ml e inmediatamente se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C. Las fracciones utilizadas en este estudio son las P₁+ P₂ que poseen la mayor abundancia de mAChRs y más alta actividad de NPR-GC-B (87). Adicionalmente, se realizó el mismo protocolo experimental descrito anteriormente, incubando previamente en baño de órgano las tráqueas y exponiéndolas por 20 s a carbamilcolina, procedimiento que según Uray y col. (72) favorece el anclaje de las subunidades $\alpha 1\beta 1$ que conforman a las sGC; esta fracción de membrana la denominaremos P1+P2 20"CC.

3.7 Alquilación de m₃AChR con la mostaza 4-Difenilacetoxi-N-metilpiperidina metiodida (4-DAMP).

La inactivación del m₃AChR se realizó por alquilación irreversible mediante el empleo de la mostaza 4-DAMP, en presencia de un exceso de metoctramina, antagonista selectivo del m₂AChR el cual lo protege de ser alquilado por la mostaza 4-DAMP. En este sentido, se incubó la mostaza 4-DAMP (40 nM) a 37°C por 30 min para generar el ion aziridinium que fue inmediatamente utilizado en las fracciones de membrana plasmática P1+P2 y P1+P2 20"CC previamente lavadas con metoctramina (10 μ M) por 30 min; para detener la reacción, la mezcla fue diluida 1:10 con el buffer 20 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1,0 mM DTT. Los sedimentos de las membranas tratadas con la mostaza 4-DAMP fueron recolectadas una vez centrifugadas a 150.000 *g* por 15 min. Se realizaron tres lavados con el buffer anteriormente nombrado para remover el exceso de mostaza 4-DAMP y metoctramina y las membranas alquiladas fueron dispensadas en volúmenes pequeños de buffer a una concentración de 1 mg de proteína/ml. Las muestras fueron utilizadas inmediatamente o conservadas en nitrógeno líquido (37,88).

3.8 Determinación de la actividad de la Guanililciclasa.

La actividad de la Guanililciclasa se determinó siguiendo el método descrito por Lippo de Becemberg y col. (85-86). La mezcla de reacción, volumen total de 125 μ l, contiene el Reactivo 1 (R1) compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,6; $MnCl_2$ 3 mM; 500 μ M GTP, y un sistema regenerador de GTP (R2) (5 mM creatina fosfato; 10 U de fosfocreatina quinasa por ensayo en albúmina sérica bovina deslipidizada al 0,1 %). La preparación que contenía a la enzima (20 μ g de proteína) es añadida posteriormente y se incuba por 5 min a 37 °C. La reacción enzimática es terminada por la adición de 10 μ L de EDTA 167 mM pH 7,5 seguida por el calentamiento en un baño de agua a ebullición y enfriada en hielo. El GMPc se determina por radioinmunoensayo usando el sistema de determinación de GMPc Biotran de Amershan® en 50 μ L del sobrenadante de la reacción obtenido después de la centrifugación a 12.000 g por 5 min a temperatura ambiente. La radiactividad fue medida por espectrofotometría de centelleo líquido. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Lowry (83) modificado por Bensadoun y Weinstein (84) utilizando BSA como estándar.

3.9 Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B activada con CNP-53 y de la sGC activada por SNP en presencia de péptidos C-Terminal de las proteínas α -Gi/o.

Basado en la hipótesis del “Latch” anteriormente mencionada (37), se diseñaron una serie de péptidos sintéticos cuya secuencia primaria es la región C-terminal de las subunidades α de las proteínas Gi/o, dichos péptidos poseen la siguiente estructura primaria.

α -Gi1-2: KNVQFVFDAVTDVVIKNNLKDCGLF

α -Gi3: NVQFVFDAVTDVVIKNNLKECGLY

α -Go1: NIQVVFDAVTDIIIANNLRGCGLY

α -Go2: NIQFVFDAVTDVIIAKNLRGCGLY

Estos péptidos fueron disueltos en agua desionizada estéril, para preparar una solución madre la cual fue diluida en serie para evaluar su efecto sobre la actividad de:

1. La NPR-GC-B activada por CNP-53 en membranas P1+P2.
2. La sGC activada por SNP en membranas P1+P2 20''CC. Ambas determinaciones fueron realizadas siguiendo el **Esquema 5** :

Esquema 5. Actividad de las NPR-GC-B o sGC expuestas a Péptidos C- terminales de las proteínas α-Gi/o.		
	Muestras	Control
R1 + R2	125 μ l	125 μ l
P1+P2 O P1+P2 20''CC	20 μ g	20 μ g
Péptidos Carboxilo terminal (1:1, 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32)	20 μ l	-
Incubar por 5 min a 37°C		
CNP-53 O SNP	10 ⁻⁷ μ M	10 ⁻⁷ μ M
	50 μ M	50 μ M
Incubar por 5 min a 37°C		
EDTA 167 mM pH 7,5	10 μ l	10 μ l
Se calienta a ebullición y luego se enfría en hielo.		

3.10 Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC alquiladas, activadas con carbamilcolina o Mastoparán en presencia de anticuerpos anti-m2AChR, anti-β o anti-αGi/o.

En este experimento se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-αGi/o, anti-β y anti-m2AChR sobre la actividad de las NPR-GC-B y de la sGC en membranas alquiladas con mostaza 4-DAMP y activadas con carbamilcolina o Mastoparán en simultáneo con CNP-53 o SNP, respectivamente (**Esquema 6**).

Esquema 6. Actividad de las NPR-GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC Alquiladas, expuestas a anticuerpos anti-αGi/o β y anti-m2AChR y activadas con carbamilcolina o Mastoparán.		
	Muestras	Control
R1 + R2	125 µl	125 µl
P1+P2 o P1+P2 20''CC Alquiladas con mostaza 4-DAMP	20µg	20µg
Anticuerpos anti-αGi/o anti-αGo anti-αGi1 anti-αGi2 anti-αGi3 anti-β1 anti-β4 Anticuerpos anti-m2AChR	20 µl	—
Incubar por 5 min a 37°C		
CNP-53 o SNP	10 ⁻⁷ µM	10 ⁻⁷ µM
	50µM	50µM
Carbamilcolina	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵ M
o Mastoparán	5-200µM	5-200µM
Incubar por 5 min a 37°C		
EDTA 167 mM pH 7,5	10 µl	10 µl
Se calienta a ebullición y luego se enfría en hielo.		

3.11 Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC incubadas con anticuerpos anti-m3AChR, activadas con carbamilcolina o Mastoparán, en presencia de anticuerpos anti-m2AChR, anti- β o anti- α Gi/o.

En este experimento se evaluó el efecto de los anticuerpos anti-Gi-o, anti- β y anti-m2AChR sobre la actividad de las NPR-GC-B o de las sGC en fracciones de membrana activadas con carbamilcolina o Mastoparán en simultáneo con CNP-53 o SNP, en membranas bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR (**Esquema 7**).

Esquema 7. Actividad de las NPR-GC-B o sGC en membranas P1+P2 o P1+P2 20''CC bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR, expuestas a anticuerpos anti-m2AChR, anti- β o anti- α Gi/o, activadas con carbamilcolina o Mastoparán.		
	Muestras	Control
R1 + R2	125 μ l	125 μ l
P1+P2 o P1+P2 20''CC	20 μ g	20 μ g
Anticuerpos anti-m3AChR	20 μ l	20 μ l
Incubar por 5 min a 37°C		
Anticuerpos anti- α Gi/o anti- α Go, anti- α Gi1 anti- α Gi2, anti- α Gi3 anti- β 1, anti- β 4 Anticuerpos anti-m2AChR	20 μ l	-
Incubar por 5 min a 37°C		
CNP-53 o SNP	10 ⁻⁷ μ M 50 μ M	10 ⁻⁷ μ M 50 μ M
Carbamilcolina o Mastoparán	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵ M 5-200 μ M	10 ⁻⁹ -10 ⁻⁵ M 5-200 μ M
Incubar por 5 min a 37°C		
EDTA 167 mM pH 7,5	10 μ l	10 μ l
Se calienta a ebullición y luego se enfría en hielo.		

3.12 Método estadístico.

Se representó gráficamente el promedio $\pm$ la desviación estándar de al menos tres determinaciones. Se realizaron análisis de varianza de una vía y pruebas post-hoc de Tukey-Kramer. Las comparaciones de pares se hicieron mediante t-Student. Se consideró como significativa una diferencia menor al 5% ($p < 0,05$).

IV Resultados

4.1 Efecto del Mastoparán sobre las señales de GMPc inducidas por carbamilcolina en el MLTB.

En las **Figuras 20 y 21** se muestra el efecto de diferentes concentraciones de Mastoparán sobre los niveles de GMPc inducidos por carbamilcolina a la concentración de $1 \times 10^{-5} \text{M}$. Se observó que la activación muscarínica inducida por el agonista carbamilcolina provoca en el MLTB dos señales de GMPc tal como ha sido descrito previamente. Al pre-incubar con Mastoparán a concentraciones crecientes (5-100 nM), se observó que la primera señal es parcialmente inhibida hasta un 59,5% a la dosis máxima de 100 nM de Mastoparán, lo cual representa una ligera fluctuación en comparación con el 56,6% de inhibición que se observó a 50 nM de Mastoparán. Esto sugiere que la primera señal es parcialmente sensible a la acción del Mastoparán mientras que la segunda señal desaparece en un 82,4% a una concentración de 25 nM y totalmente con 50 nM de Mastoparán (**Figuras 20 y 21**).

4.2 Efecto de la PTX sobre las señales de GMPc inducidas por carbamilcolina en MLTB.

Para estudiar el efecto de las proteínas G heterotriméricas de la familia Gi/o sobre la activación muscarínica, las franjas musculares se pre-incubaron con *Toxina pertussis* (PTX) a la concentración de 200 ng/ml (62). Como se observa en la **Figura 22**, en presencia de PTX las dos señales de GMPc se incrementan en un 17,3% la primera señal (20 s) y en 51% la segunda (60 s). Esto podría indicar que las proteínas Gi/o están vinculadas con la modulación de las señales de GMPc inducidas por carbamilcolina en el MLTB y por tanto podrían estar vinculadas con sus efectos fisiológicos.

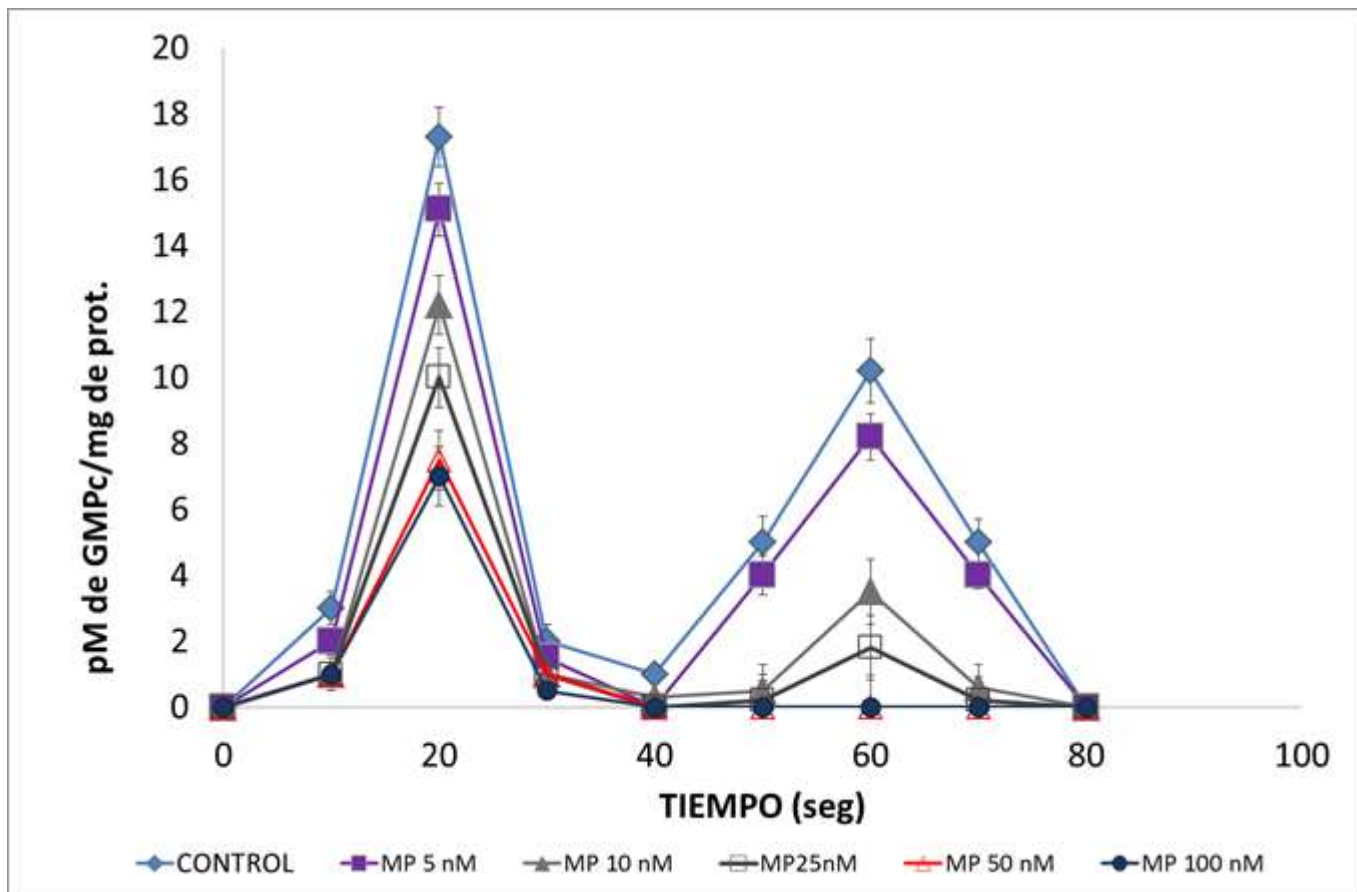


Figura 20. Efecto del Mastoparán a concentraciones crecientes en función del tiempo sobre los niveles del GMPc inducidos por la carbamilcolina en el MLTB.

Las franjas musculares fueron estabilizadas y posteriormente pre-incubadas por 10 min con Mastoparán (0-100 nM) bajo las mismas condiciones experimentales según el esquema 4. Posteriormente se añadió, carbamilcolina [$1 \times 10^{-5}M$] y los fragmentos fueron removidos cada 10 s; el contenido de GMPc fue determinado por duplicado. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de los niveles de GMPc medidos en 3 tráqueas distintas.

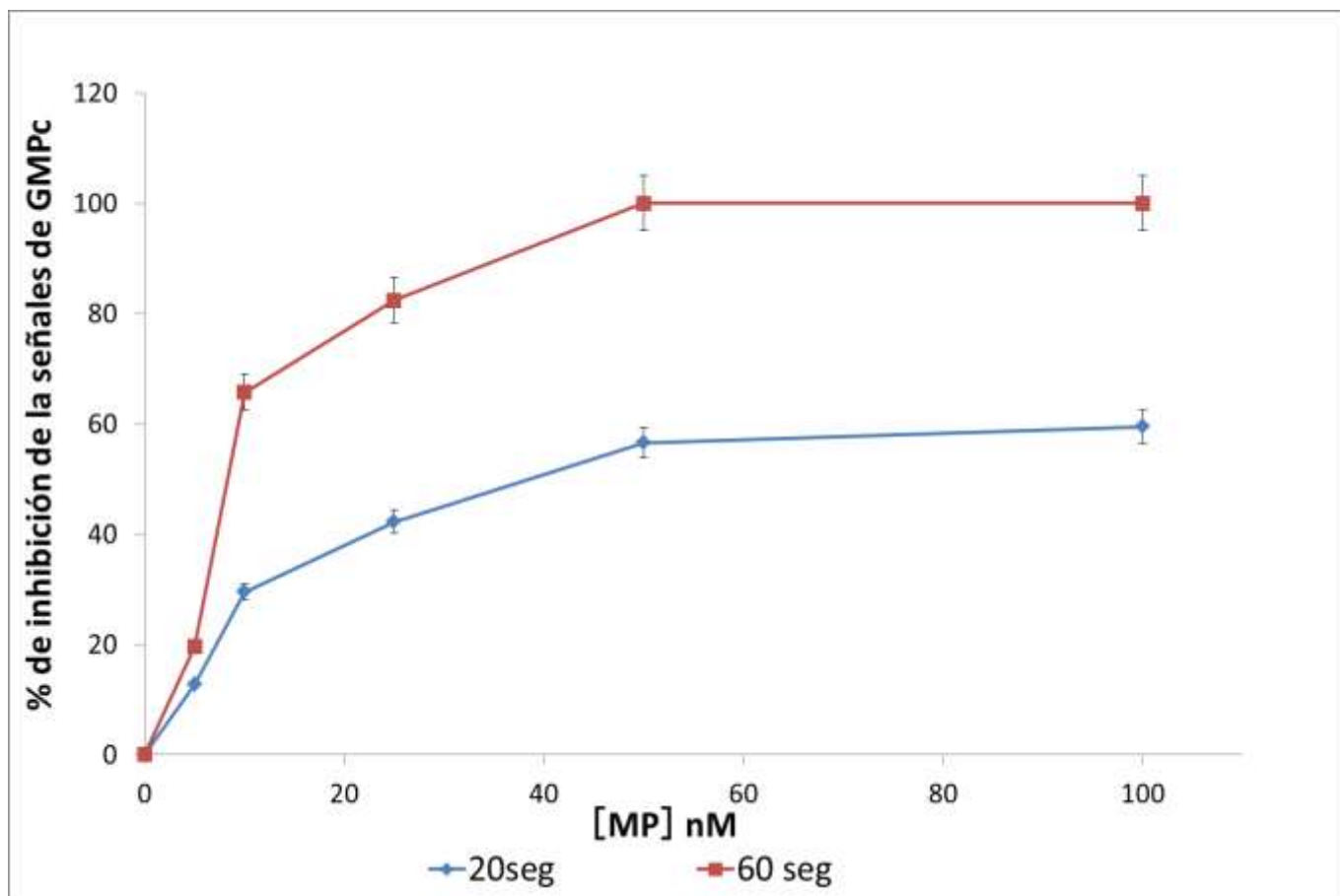


Figura 21. Porcentaje de inhibición de los niveles de GMPc en las señales de 20 y 60 s en presencia de concentraciones crecientes de Mastoparán.

4.3 Efecto de la PTX sobre las señales de GMPc en MLTB pre-incubado con Mastoparán y activado con carbamilcolina.

Con el fin de dilucidar si el Mastoparán está relacionado con la activación de proteínas Gi/o acopladas a receptores muscarínicos se realizaron mediciones de GMPc. En este sentido, se pre-incubó con PTX a 200 ng/ml por 3 horas y añadimos posteriormente Mastoparán 50 nM, por 10 min; como se muestra en la **Figura 23** ocurre la restauración de las señales de GMPc a niveles cercanos al control lo cual sugiere que el efecto de Mastoparán sobre las señales de GMPc puede estar mediado por la activación de las proteínas Gi/o sensibles a PTX.

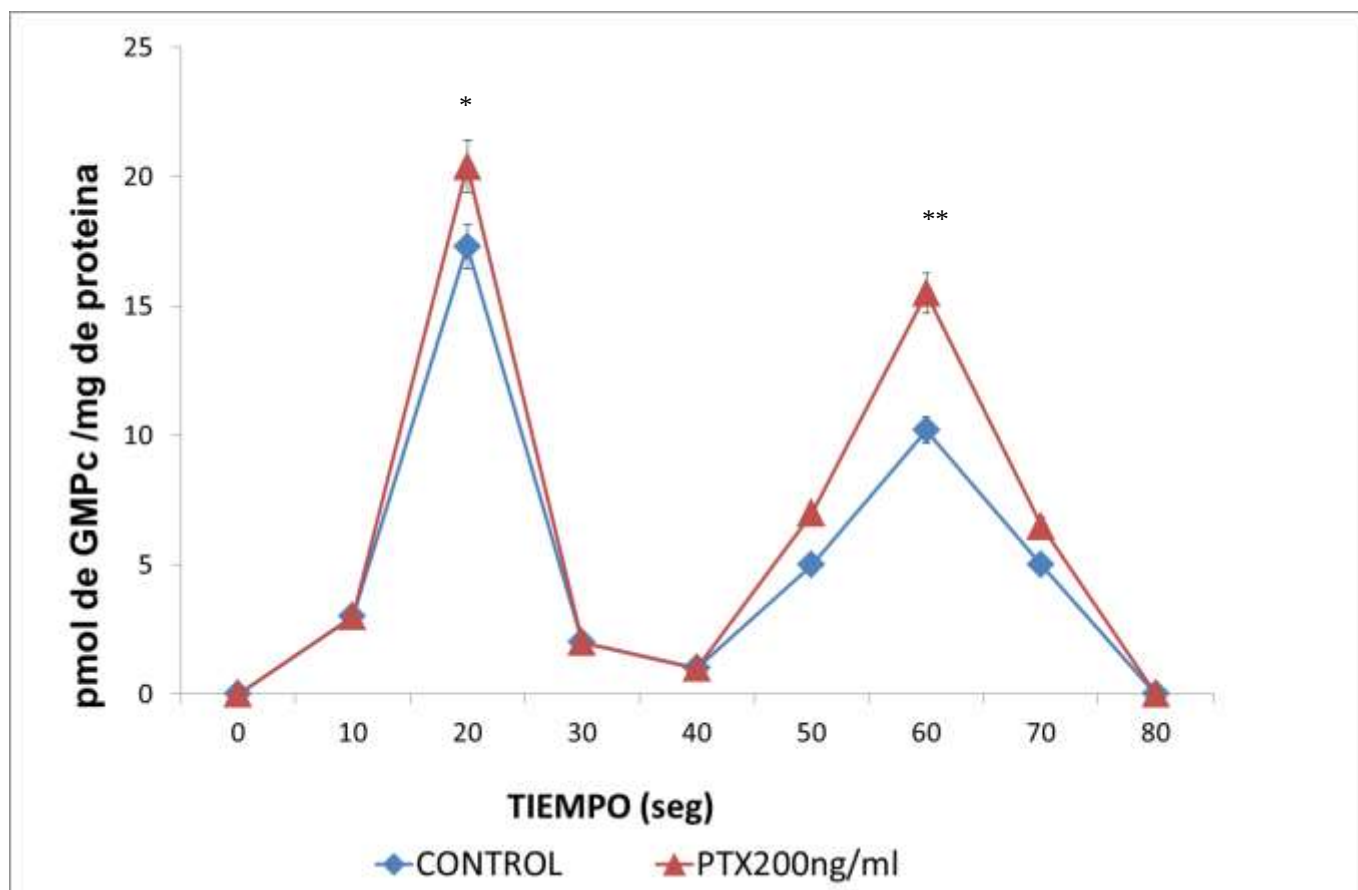


Figura 22. Efecto de la PTX 200 ng/ml sobre los niveles de GMPc inducidos por la activación muscarínica con carbamilcolina 10^{-5} M en el MLTB. Las franjas musculares fueron estabilizadas y pre-incubadas con PTX según esquema 4, una vez cumplidos los 200 min se añadió, carbamilcolina 1×10^{-5} M. Los fragmentos fueron removidos cada 10 s y el contenido de GMPc fue determinado por duplicado. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm DS$ del nivel de GMPc medidos en 3 tráqueas distintas, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

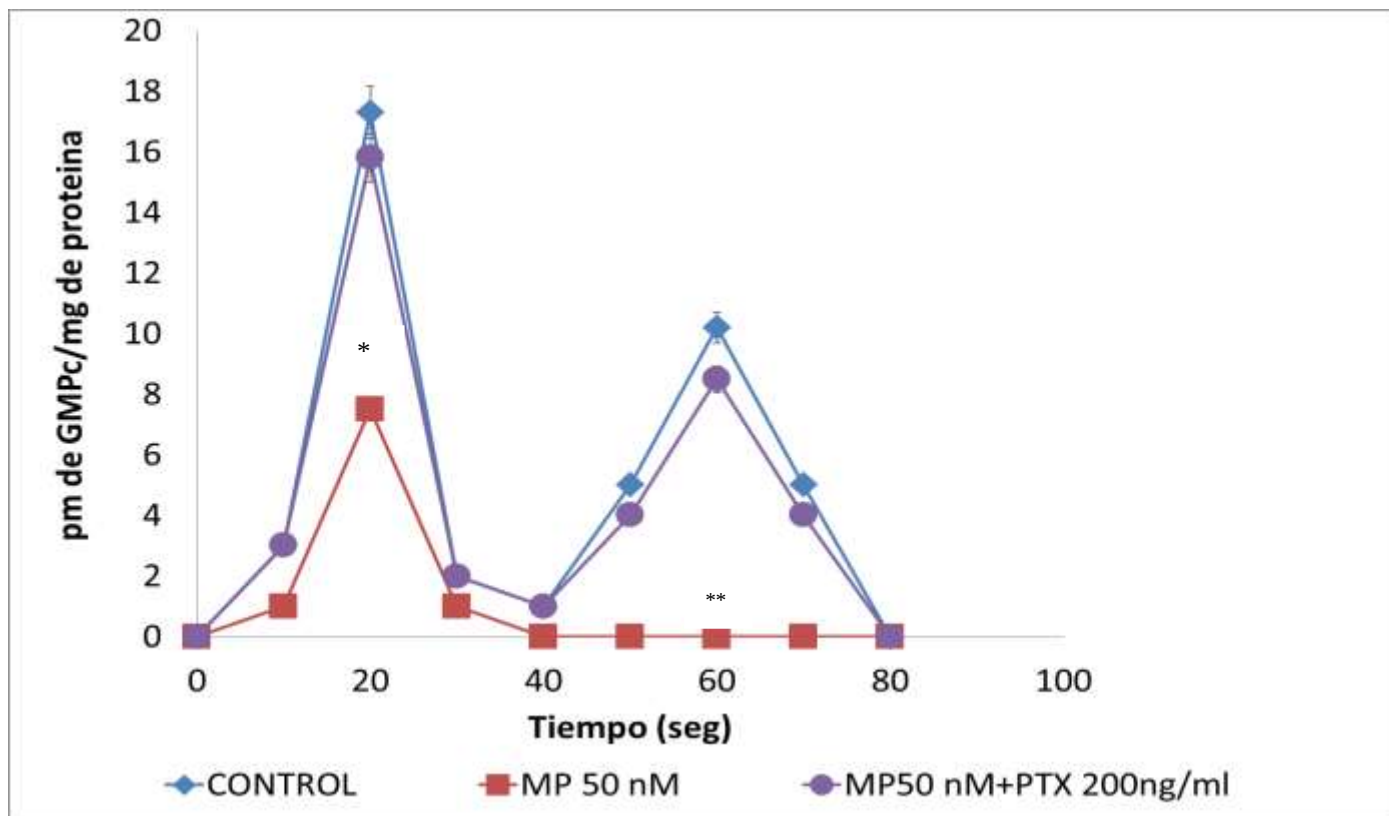


Figura 23. Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc de fragmentos musculares pre-incubados con Mastoparán. Las franjas musculares fueron estabilizadas y pre-incubadas con MP y/o PTX según esquema 4, una vez cumplidos los 200 min se añadió, carbamilcolina 1×10^{-5} M, los fragmentos fueron removidos cada 10 s y el contenido de GMPc fue determinado por duplicado. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de los niveles de GMPc medidos en 3 tráqueas distintas * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

4.4 Efecto de la PTX sobre la activación de las sGC y NPR-GC-B con sus respectivos ligandos en presencia de Mastoparán.

Dado que la PTX revierte el efecto de Mastoparán sobre las señales muscarínicas en las que intervienen las enzimas NPR-GC y la sGC, en este trabajo evaluamos el efecto de PTX sobre la actividad de ambas Guanililciclasas activadas por sus ligandos específicos a saber CNP-53 y Nitropusiato de Sodio (SNP), respectivamente donde se observa que ambas son sensibles a la acción de Mastoparán y que en ambos casos el efecto de Mastoparán se revierte por acción de la PTX (85) (**Figuras 24 y 25**).

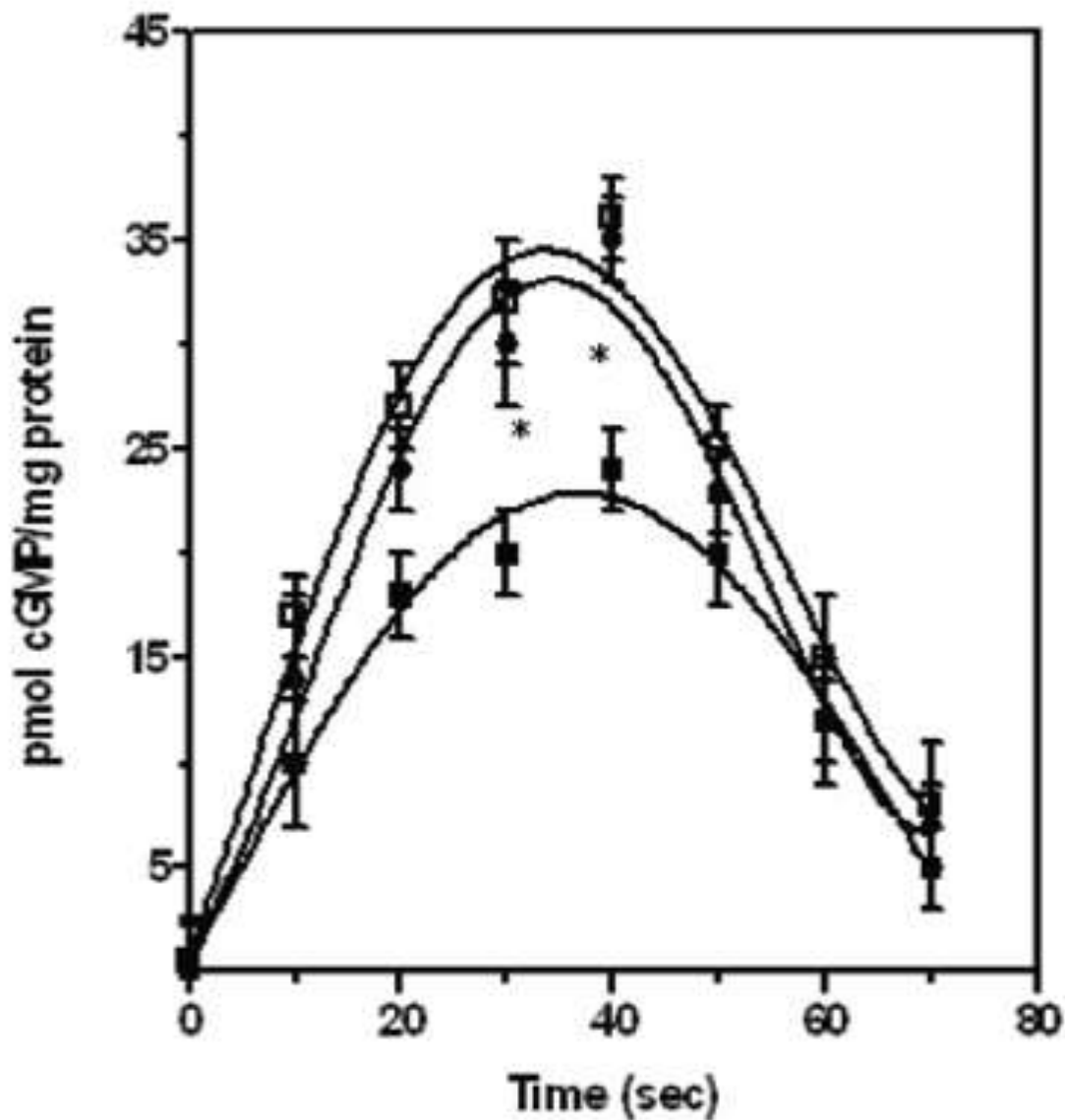


Figura 24. Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc inducidos por Nitroprusiato de Sodio (SNP) 50 μ M en presencia de Mastopar n. Las franjas musculares fueron estabilizadas y pre-incubadas con MP y/o PTX según esquema 4, una vez cumplidos los 200 min se a nadi  el SNP 50 μ M según el caso y se procede a retirar las tiras de músculo cada 10 s. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de 3 franjas musculares de diferentes tráqueas. (* $p < 0,05$) ($\square$ SNP, $\blacksquare$ MP+SNP $\blacklozenge$ PTX+MP+SNP) (82).

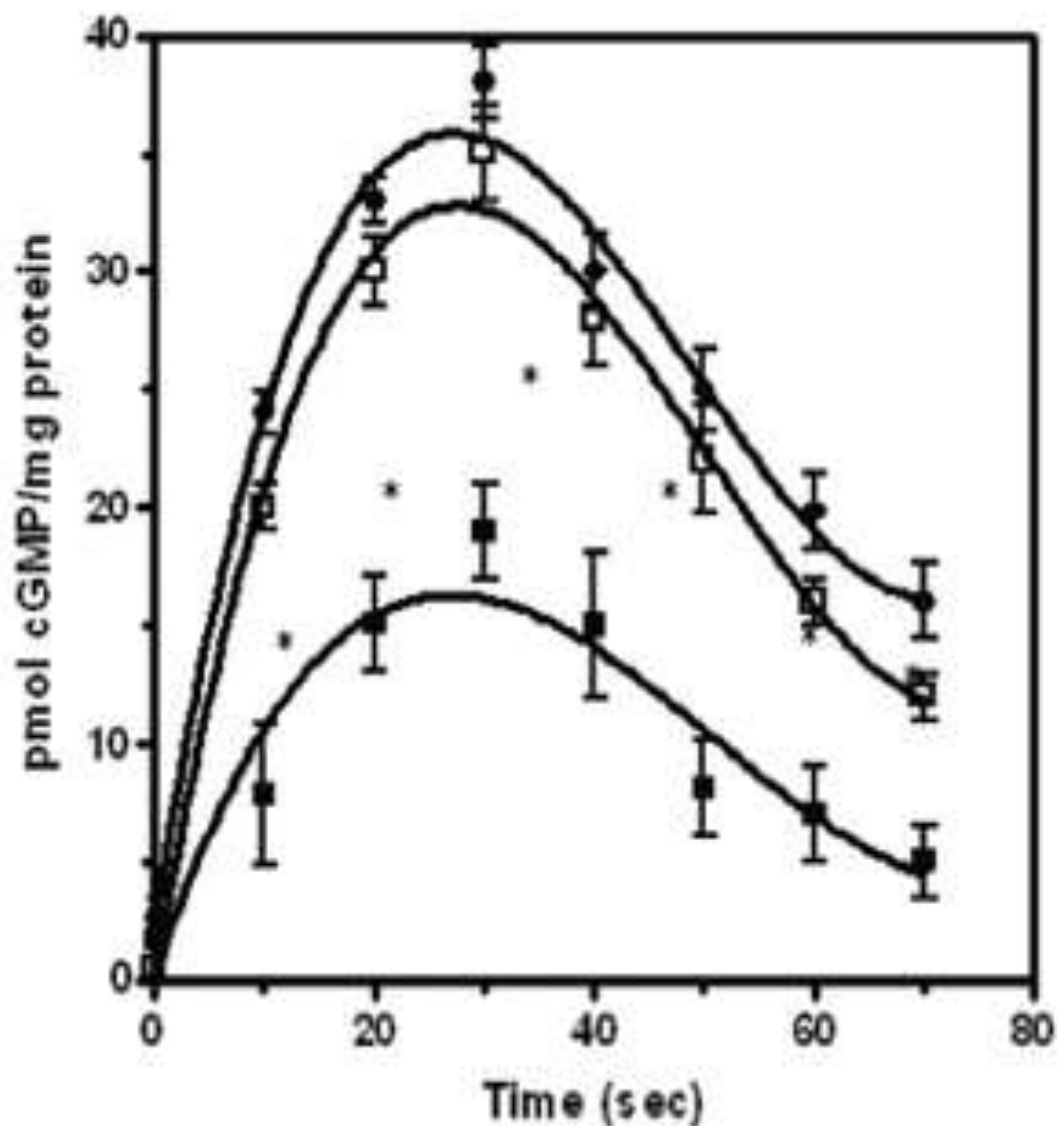


Figura 25. Efecto de la PTX sobre los niveles de GMPc inducidos por CNP-53 10^{-7} en presencia de Mastoparén. Las franjas musculares fueron estabilizadas y pre-incubadas con MP y/o PTX según esquema 4, una vez cumplidos los 200 min se añadió CNP-53 10^{-7} según el caso y se procede a retirar las tiras de músculo cada 10 s. Cada valor corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de 3 franjas musculares de diferentes tráqueas. (* $p < 0,05$) ($\square$ PTX+MP+CNP-53, $\blacksquare$ MP+CNP-53, $\blacklozenge$ CNP-53) (82).

4.5 Efecto de la PTX sobre la actividad contráctil inducida con carbamilcolina MLTB.

Dado que existe una vinculación directa entre las señales de GMPc y la contracción del MLTB, se realizaron experimentos en los cuales se evaluó la actividad contráctil del MLTB en presencia de PTX y Mastoparán donde se observó que PTX incrementó el porcentaje de contracción comparado con el control y revierte parcialmente el efecto inhibidor de la contracción ejercido por Mastoparán (**Figura 26**).

Estos experimentos ponen de manifiesto varios aspectos:

1. Existe un efecto modulador de las proteínas Gi/o sobre la contracción y los niveles de GMPc, lo que se evidencia con el incremento de este segundo mensajero en las señales a los 20 s y 60 s, respectivamente y con el incremento en el porcentaje de contracción inducida por carbamilcolina en el MLTB en presencia PTX.
2. El efecto inhibitorio ejercido por Mastoparán puede ser un efecto mediado por proteínas Gi/o, ya que tanto las señales de GMPc a los 20 y 60 s como la actividad contráctil se revierten significativamente cuando pre-incubamos con PTX, razón por la cual en este trabajo de investigación nos propusimos determinar qué subfamilia de las proteínas Gi/o es la responsable de inhibir por vía muscarínica a las NPR-GC-B y a las sGC. Para estudiar estas últimas, nos fundamentamos en los hallazgos de Uray y col. (72) quienes demostraron que 20 s después de estimular con carbamilcolina ocurre una translocación de las subunidades $\alpha 1\beta 1$ que componen a la enzima sGC, lo cual se corroboró mediante la medición de la actividad Guanililciclase estimulada con SNP sobre fracciones P1+P2, que para efectos de este trabajo denominaremos P1+P2 activadas por 20'' con carbamilcolina, (P1+P2 20''CC), observándose que en estas fracciones existe una actividad GC inducida por SNP cuatro veces superior a P1+P2 (**Figura 27**).

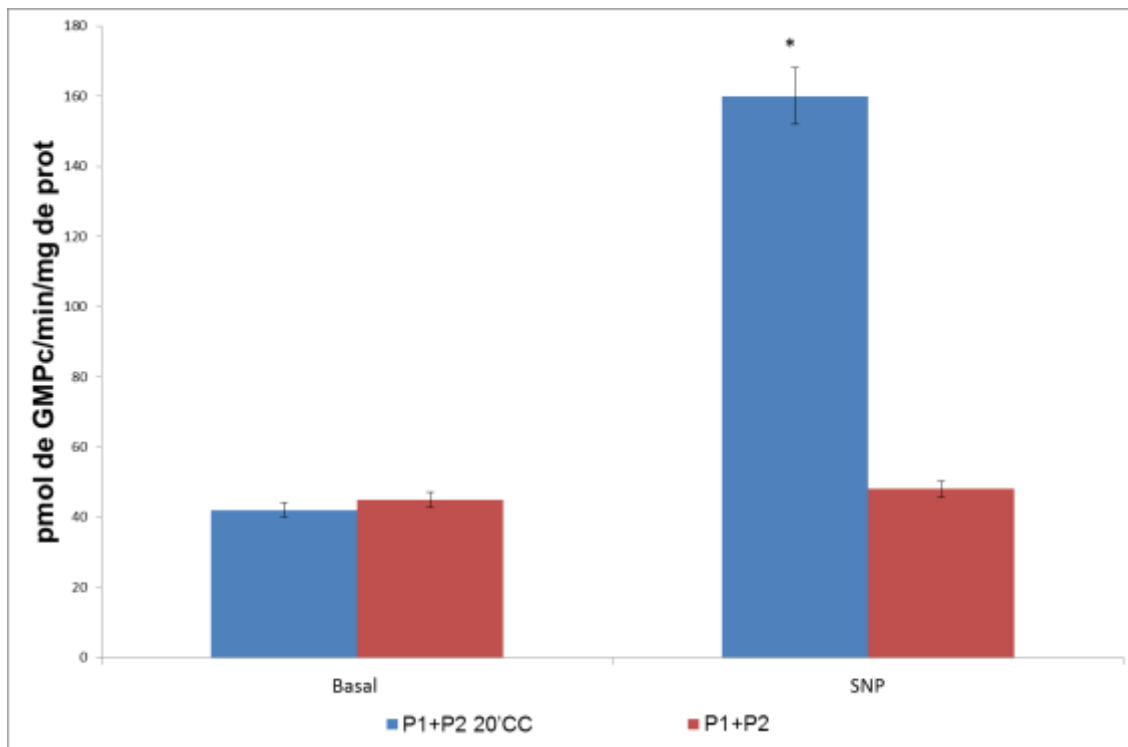


Figura 27. Efecto del SNP 50 μ M sobre la actividad GC en fracciones P1+P2 y P1+P2 20'CC. Se procedió según esquema 5 (control) presentado en materiales y métodos cada punto corresponde a un $n \geq 3$. $p < 0,01$ en la gráfica se observa el efecto de SNP sobre la actividad Guanililciclase en las fracciones P1+P2 20'CC y fracciones P1+P2. Cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ $*(p < 0,01)$.

4.6 Evaluación de la actividad de NPR-B GC activada con CNP-53 y de la sGC activada por SNP en presencia de péptidos C-Terminales de las proteínas α -Gi/o.

Con base a la hipótesis Latch anteriormente mencionada se determinó la actividad Guanililciclase en fracciones P1+P2 en presencia de CNP-53 10^{-7} M y en fracciones P1+P2 20''CC activadas por SNP 50 μ M; a tal efecto se realizaron diluciones secuenciales de los péptidos C-terminal para las familias de proteínas α -Gi/o antes mencionadas donde se obtuvo que el péptido inhibitorio que disminuye la actividad de la NPR-GC-B en membranas P1+P2 es el correspondiente a la familia α -Go1 (**Figura 28**) y el péptido inhibitorio que inhibe la actividad de la sGC en membranas P1+P2 20''CC es el péptido α -Gi3 (**Figura 29**).

4.7 Evaluación de la actividad GC inducida con carbamilcolina 10^{-4} M en membranas P1+P2 y P1+P2 20''CC bloqueadas con anticuerpos anti m3AChR o alquiladas con la mostaza 4-DAMP.

Con el fin de corroborar que el receptor m3AChR resultó bloqueado con la alquilación o mediante el bloqueo con anticuerpos anti-m3AChR, se midió la actividad GC inducida por carbamilcolina 10^{-5} M, lo cual dio como resultado que la actividad GC desaparece casi por completo bajo estas condiciones; lo cual indica que tanto la alquilación como el bloqueo con Anticuerpos anti-m3AChR resultan ser mecanismos efectivos para obtener membranas libres de actividad muscarínica proveniente del m3AChR (**Figura 30**).

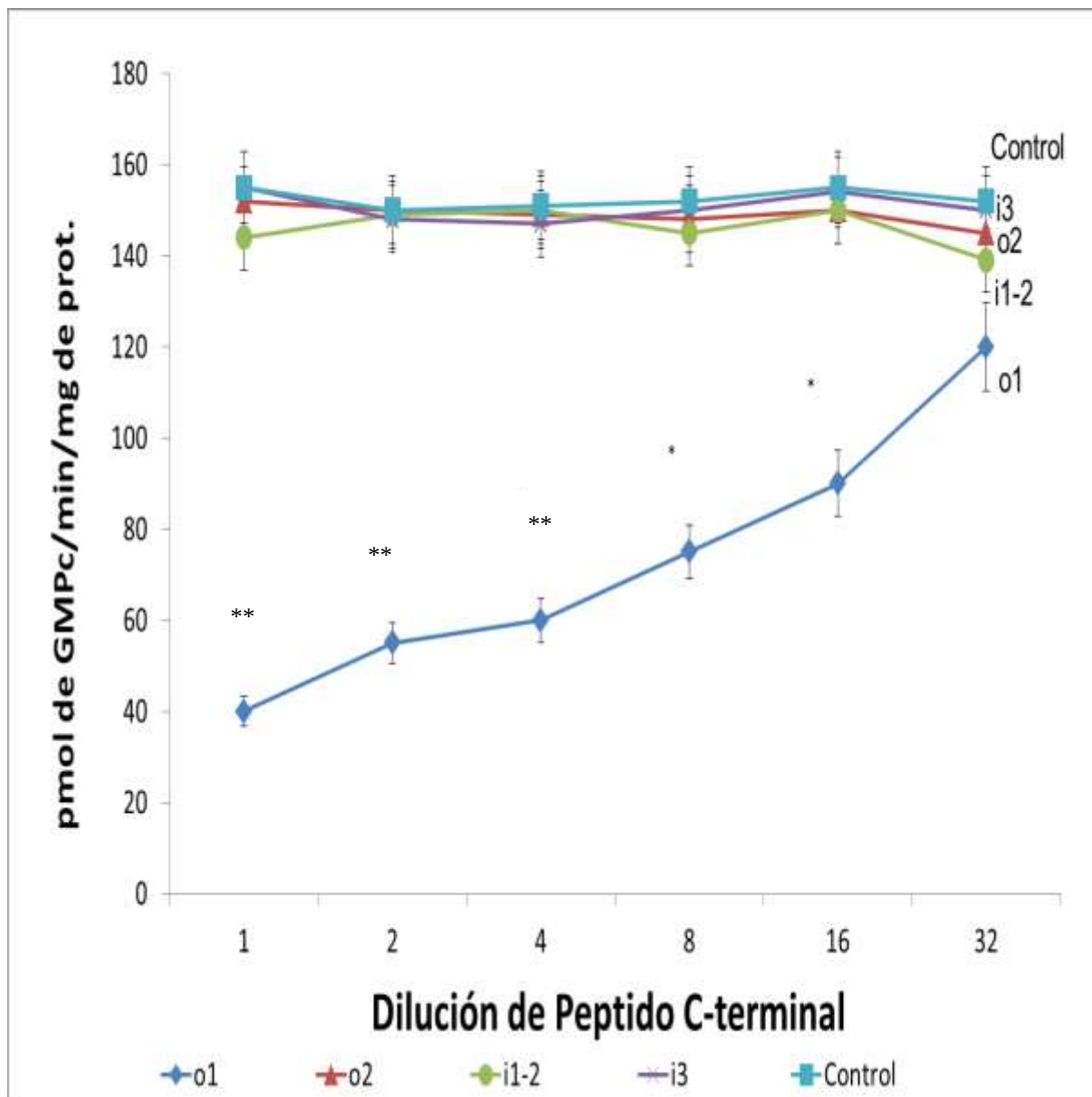


Figura 28. Efecto de los péptidos C-Terminal sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 $10^{-7}M$ en fracciones P1+P2. Se procedió según Esquema 5 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$. * ($p < 0,05$) **($p < 0,01$).

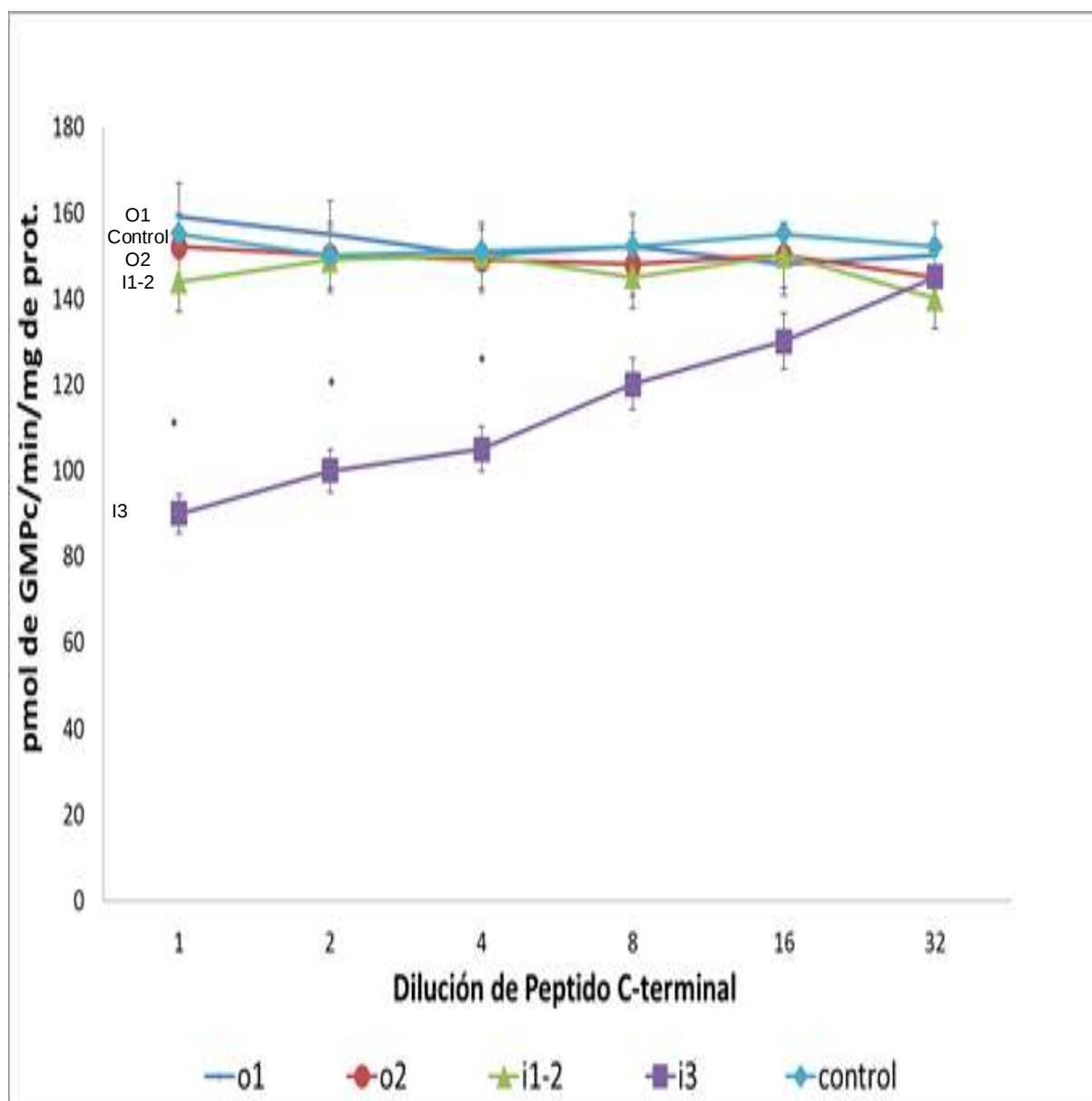


Figura 29. Efecto de los péptidos C-Terminal sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M en fracciones P1+P2 20''CC. Se procedió según el Esquema 5 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ $*(p < 0,05)$.

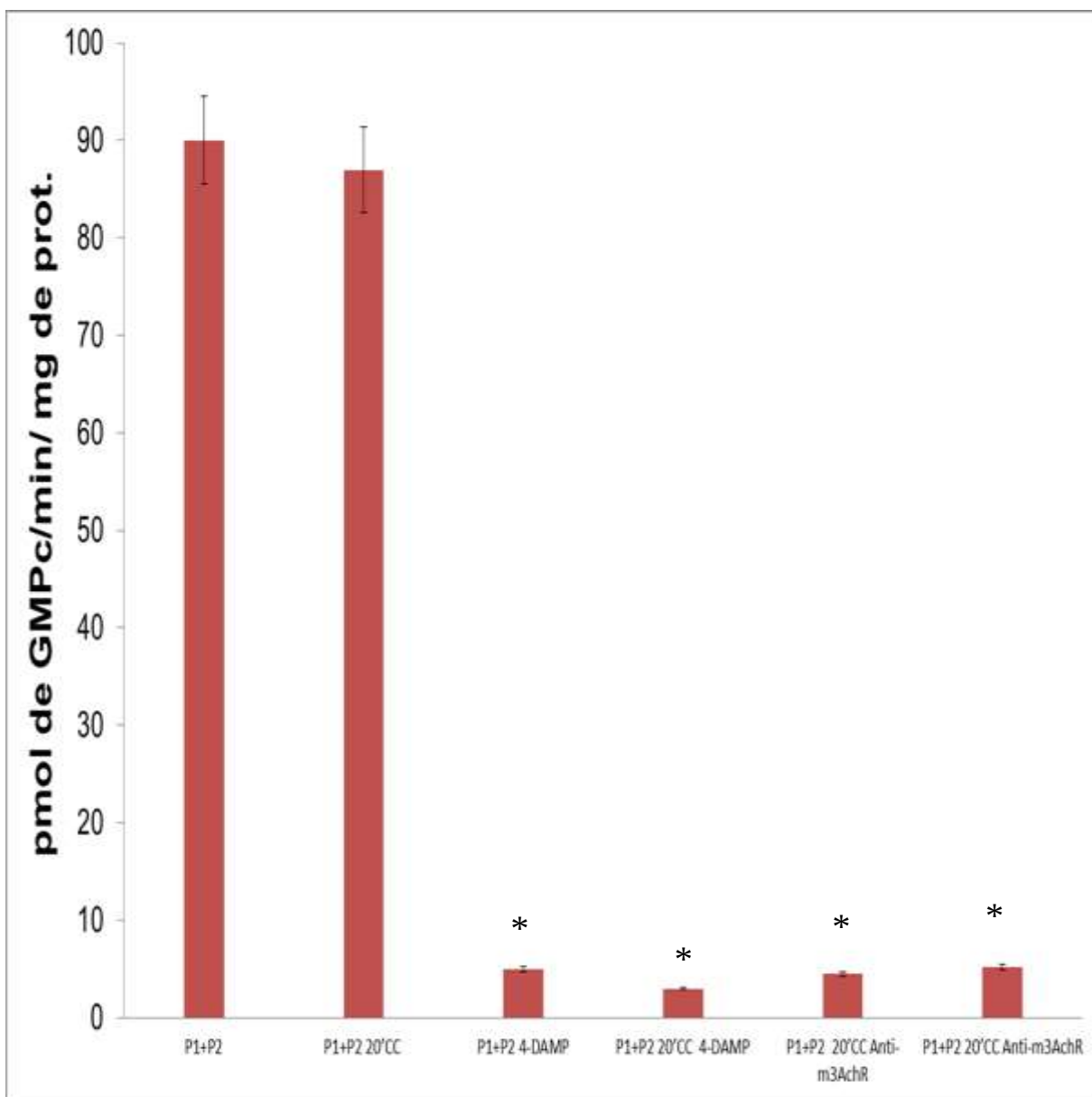


Figura 30. Actividad GC inducida con carbamilcolina 10^{-4} M en membranas P1+P2 y P1+P2 20'CC bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR o alquiladas con la mostaza 4-DAMP. Se procedió según los Esquemas 6 y 7 en condición control (sin adición de CNP-53 o SNP), cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$. (* $p < 0,01$).

4.8 Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B en fracciones de membranas P1+P2 que fueron alquiladas con la mostaza 4-DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y posteriormente activadas con carbamilcolina y CNP-53, en presencia de anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o.

Con el fin de determinar la familia de las proteínas α -Gi/o acopladas a m2AChR se alquilaron los receptores m3AChR con la mostaza 4-DAMP (**Figura 31**) o se bloquearon con anticuerpos anti-m3AChR (**Figura 32**), según descripción realizada en materiales y métodos, a fin de bloquear este receptor y preservar únicamente la actividad del receptor m2AChR; el cual es activado por carbamilcolina en simultaneo con la NPR-GC-B, la cual es activada con CNP-53 10^{-7} M.

En ambos resultados se observó que las preparaciones pre-incubadas con anticuerpos contra las subunidades α -Go y β 4 no inhibieron la actividad de la NPR-GC-B, lo que demuestra que estas subunidades de proteínas G son las responsables de la inhibición de esta enzima. Para demostrar que esta inhibición está asociada al receptor m2AChR y no a otro receptor muscarínico realizamos un bloqueo selectivo del receptor con anticuerpos anti-m2AChR donde se observó la ausencia de actividad inhibitoria (**Figuras 31-32**).

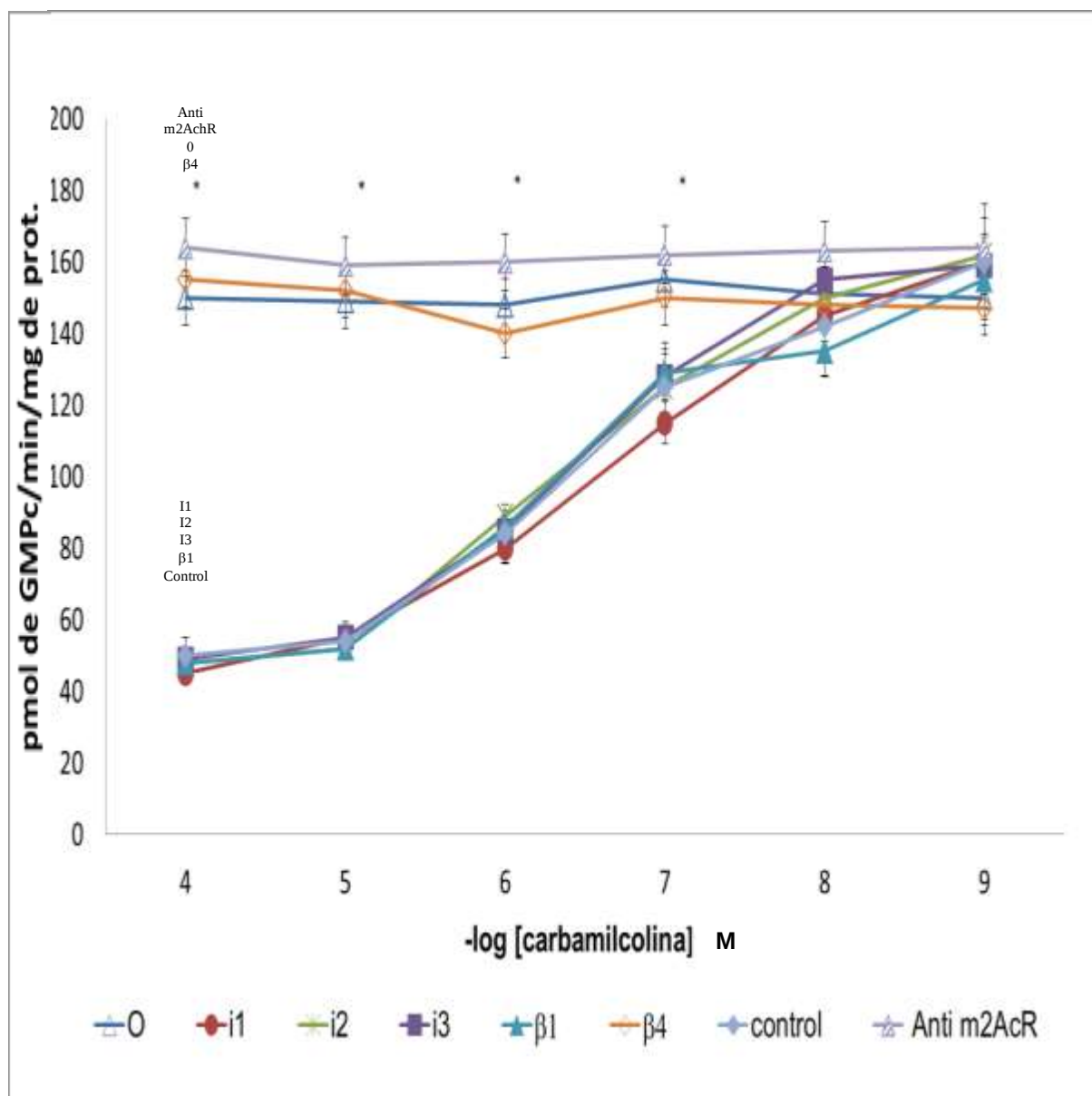


Figura 31. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 10^{-7} M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 alquiladas con la mostaza 4-DAMP. Se procedió según Esquema 6 presentado en materiales y métodos cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

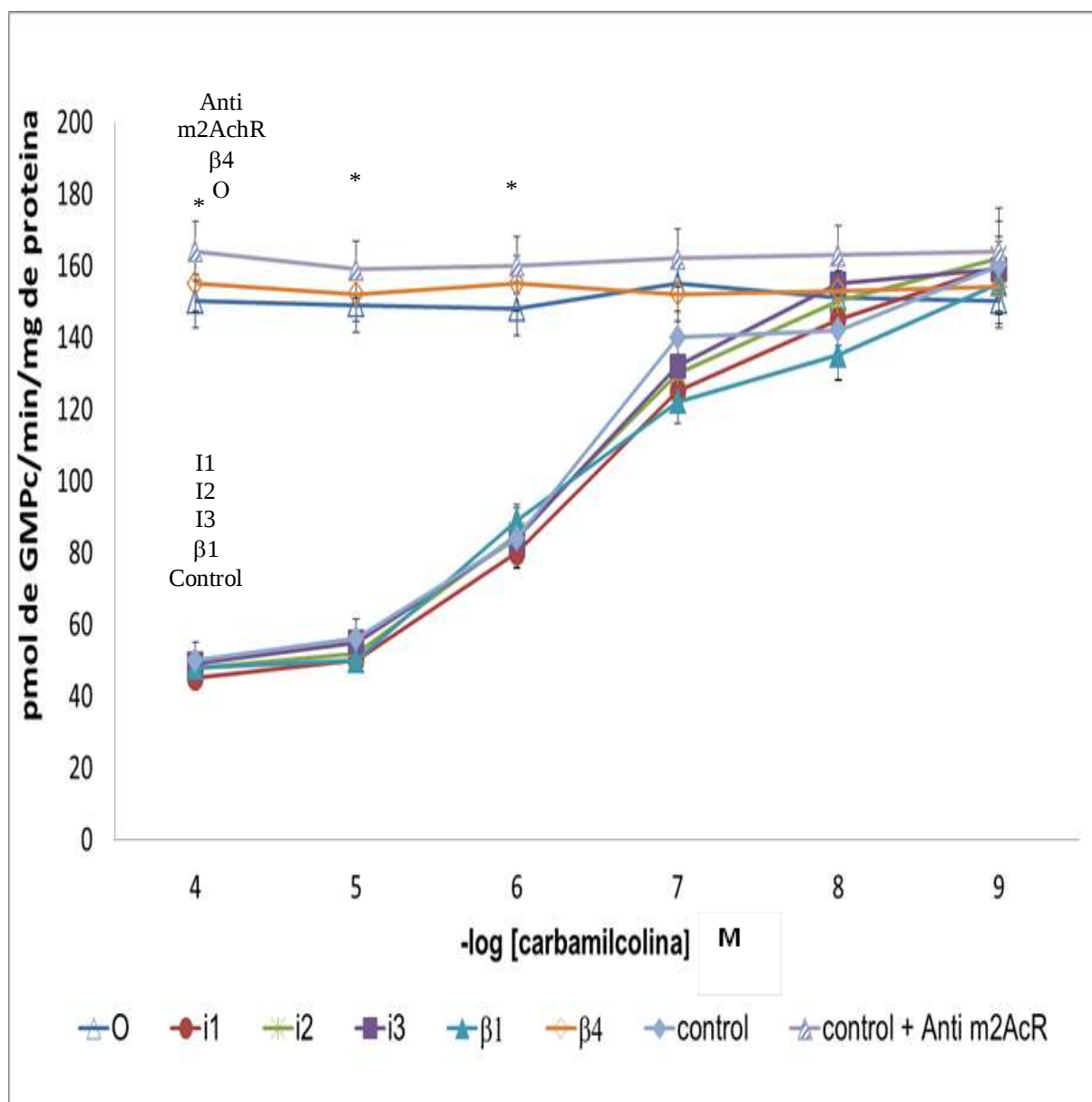


Figura 32. Efecto de los Anticuerpos anti-β o anti-αGi/o sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 $10^{-7}M$ y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 pre-incubadas con anti-m3AChR. Se procedió según esquema 7 presentado en materiales y métodos cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

4.9 Evaluación de la actividad de NPR-B GC-B en fracciones de membranas P1+P2 que fueron alquiladas con la mostaza 4-DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y posteriormente activadas con Mastoparán y CNP-53, en presencia de anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o.

Con el fin de conocer si el Mastoparán es capaz de activar directamente a la proteína Gi/o asociada al receptor m2AChR, se realizó la misma aproximación experimental, activando con Mastoparán. En estos experimentos se observó al igual que en las preparaciones anteriores, que tanto en las membrana P1+P2 alquiladas (**Figura 33**) y bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR (**Figura 34**) los anticuerpos contra las subunidades α -Go y β 4 no permitieron la inhibición de la actividad de la NPR-GC-B; sin embargo Mastoparán a diferencia de la carbamilcolina es capaz de inhibir a las proteínas Gi/o en presencia de Anticuerpos anti-m2AChR lo que indica que este péptido es capaz de activar esta cascada de señalización inhibitoria asociadas al receptor m2AChR sin actuar sobre este receptor. Para observar de forma más clara los efectos antes mencionados (**Figuras 31-34**) en los histogramas (**Figuras 35 y 36**) podemos visualizar los efectos de Mastoparán y carbamilcolina a sus máximas concentraciones en las preparaciones alquiladas y bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR. De estos resultados podemos deducir que:

1. Las preparaciones con anticuerpos α -Go y β 4 son las únicas capaces de bloquear el efecto inhibitorio de la carbamilcolina y el Mastoparán sobre la actividad de la NPR-GC-B por lo que se presume que al menos uno de los heterotrímeros activados por el receptor m2AChR contiene estas dos subunidades.
2. El Mastoparán es capaz de ejercer un efecto similar al de la carbamilcolina sin activar al receptor m2AChR lo cual se visualiza en el hecho que al bloquear con anticuerpos anti-m2AChR la actividad inhibitoria se preserva.
3. El Mastoparán es más efectivo en la activación de las proteínas Gi/o que al m2AChR, lo cual observamos en los valores de % máximo de Inhibición, el cual es 17,1% mayor en membranas alquiladas y 20,2% mayor en membranas bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR (**Tabla 8**). Esto

indica que Mastoparén puede activar a proteínas Gi/o no asociadas a m2AChR o incrementar la actividad GTP-asa como fue descrito por Higachijima y col. (75).

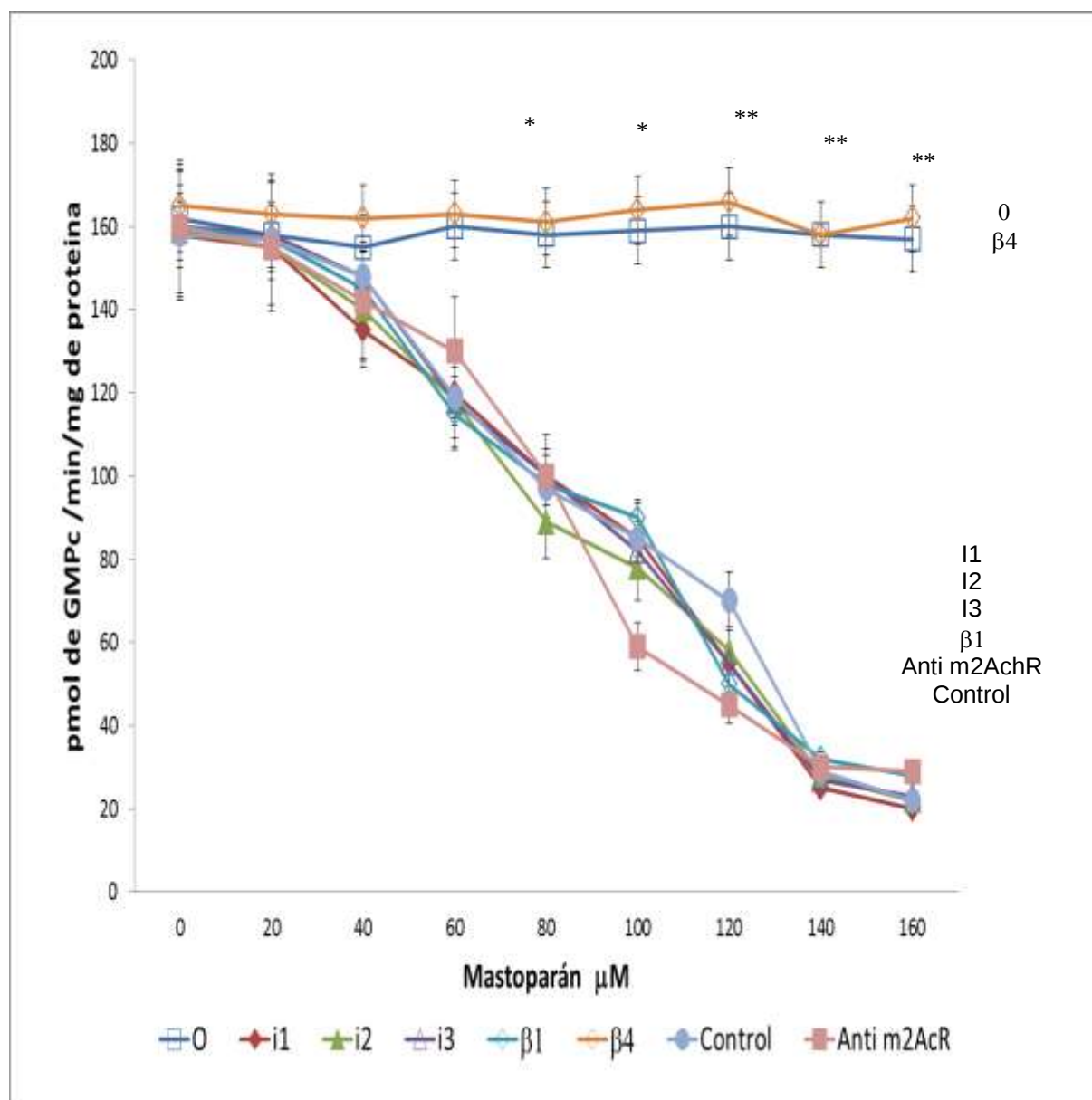


Figura 33. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- $\alpha\text{Gi/o}$ sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 10^{-7}M y Mastoparn en fracciones P1+P2 alquiladas con las mostaza 4-DAMP. Se procedió según Esquema 6 presentado en materiales y métodos cada punto corresponde a $\bar{X} \pm \text{DS}$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$) ($p < 0,01$).**

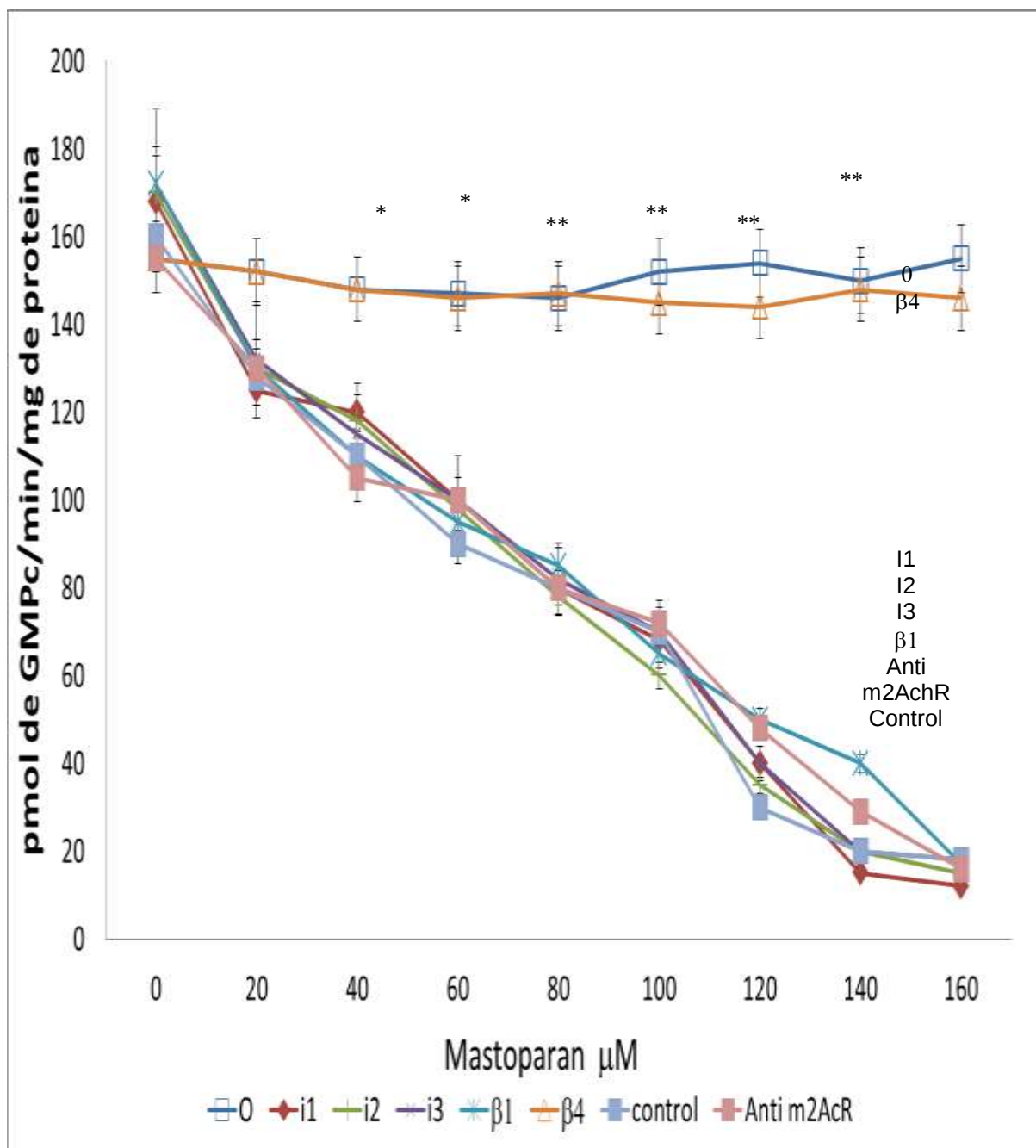


Figura 34. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- $\alpha\text{Gi/o}$ sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 10^{-7}M y Mastopar n en fracciones P1+P2 pre-incubadas con anti-m3AChR. Se procedió según esquema 7 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm \text{DS}$ de $n \geq 3$ $^*(p < 0,05)$ $^{}(p < 0,01)$.**

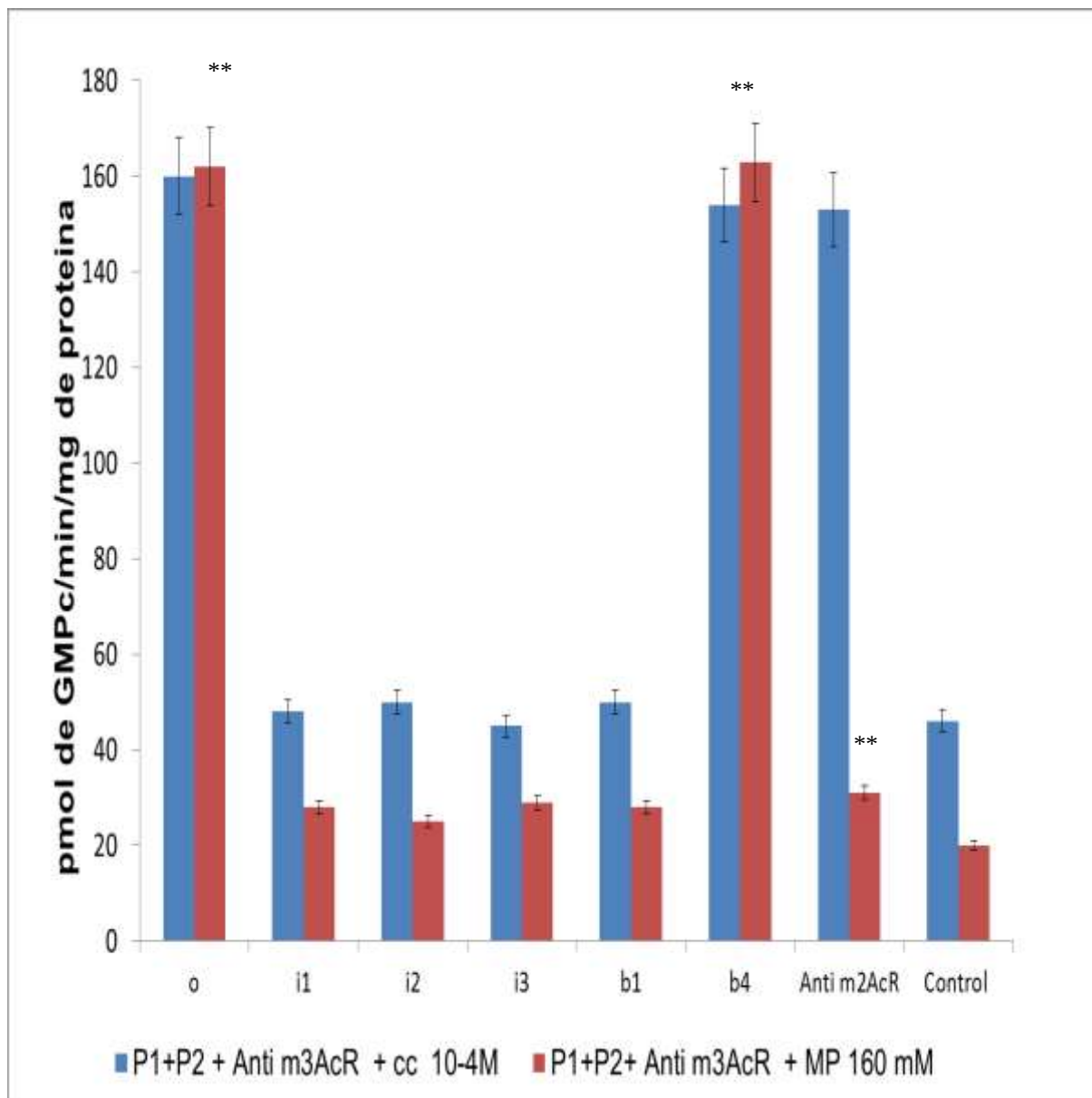


Figura 35. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 10^{-7} M y Carbamilcolina o Mastoparán a las máximas concentraciones en fracciones P1+ P2 Pre-incubadas con anti-m3AchR. Tomado de Figuras 32 y 34 (** $p < 0,01$).

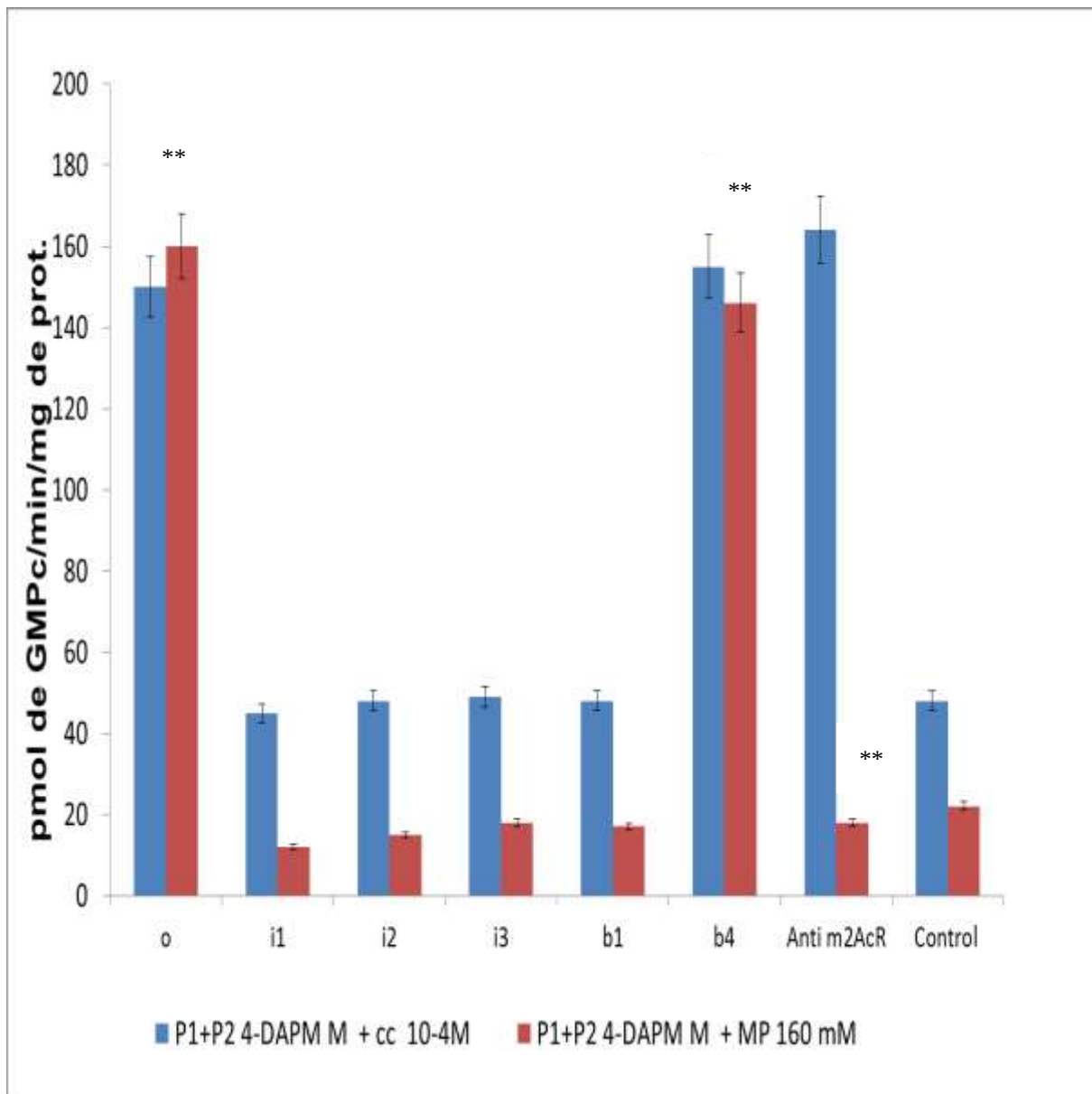


Figura 36. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la NPR-GC-B estimulada por CNP-53 10^{-7} M y Carbamilcolina o Mastoparán a las máximas concentraciones en fracciones P1+ P2 alquiladas con la mostaza 4-DAMP. Tomado de Figuras 31 y 33 (** $p < 0,01$).

Tabla 8. DE₅₀ y % Máximo de Inhibición de las membranas P1+P2 en condición control.

Membranas P1+P2.	DE50	% máximo de Inhibición
Mostaza 4-DAMP + CC (-log)	3,8 M	69,0
Mostaza 4-DAMP + MP	83,2 µM	86,1
Anti-m3AChR+ CC(-log)	3,6 M	67,0
Anti-m3AChR+ MP	84,3 µM	87,2

4.10 Evaluación de la actividad de la sGC en fracciones de membranas P1+P2 20''CC que fueron alquiladas con la mostaza 4- DAMP o Bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y activadas con carbamilcolina y SNP, en presencia de anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o.

Con el fin de determinar la familia de las proteínas Gi/o acopladas a m2AChR se alquilaron los receptores m3AChR con la mostaza 4-DAMP o se bloquearon con anticuerpos anti-m3AChR, según lo descrito en materiales y métodos, el m2AChR es activado por carbamilcolina en simultaneo con la sGC que es activada con SNP 50 μ M, en membranas P1+P2 20''CC.

Ambos resultados indican que las preparaciones pre-incubadas con anticuerpos contra las subunidades α -Gi3 y β 1 no inhibieron la actividad de la sGC, lo que demuestra que estos subtipos de proteínas G son las responsables de la inhibición de esta enzima. Para demostrar que esta inhibición está asociada al receptor m2AChR y no a otro receptor muscarínico realizamos un bloqueo selectivo del receptor con anticuerpos anti-m2AChR donde se observó la ausencia de actividad inhibitoria (**Figuras 37 y 38**).

4.11 Evaluación de la actividad de sGC en membranas P1+P2 20'' alquiladas con la mostaza 4 DAMP o bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR, activadas con Mastoparán y SNP en presencia de anticuerpos anti- β o anti-Gi/o.

Con el fin de conocer si el Mastoparán es capaz de activar directamente a la proteína Gi/o asociada al receptor m2AChR que inhibe a la sGC, se realizó la misma aproximación experimental, activando con Mastoparán y SNP 50 μ M. Estos experimentos dieron como resultado, al igual que en las preparaciones anteriores, que tanto en las membrana P1+P2 20''CC alquiladas o bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR los anticuerpos contra las subunidades α -Gi3 y β 4 no permitieron la inhibición de la actividad de la sGC; sin embargo, Mastoparán a diferencia de la carbamilcolina es capaz de inhibir a las proteínas Gi/o en presencia de Anticuerpos anti-m2AChR lo que indica que este péptido puede activar esta cascada de señalización inhibitoria asociadas al receptor m2AChR que inhiben a la sGC sin actuar sobre este receptor (**Figuras 39 y 40**). Para observar de forma más clara los efectos antes mencionados en las **Figuras 41 y 42** podemos visualizar los efectos de Mastoparán y Carbamilcolina a sus máximas concentraciones en las preparaciones alquiladas y bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR. De estos resultados podemos deducir:

1. Las preparaciones con anticuerpos anti- α Gi3 y -anti β 1 son las únicas capaces de bloquear el efecto inhibitorio de la carbamilcolina y el Mastoparán sobre la actividad de la NPR-GC-B por lo que uno de los heterotrímeros activado por el receptor m2AChR debe contener estas dos subunidades.
2. El Mastoparán es capaz de ejercer un efecto similar al de la carbamilcolina sin activar al receptor m2AChR lo cual se visualiza en el hecho que al bloquear con Anticuerpos anti-m2AChR la actividad inhibitoria se preserva.
3. El Mastoparán es más efectivo en la activación de las proteínas Gi/o que el m2AChR lo cual observamos en los valores de % máximo de Inhibición, el cual es 20 % mayor en membranas alquiladas y 12,5 % mayor en membranas bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR (**Tabla 9**) lo que indica que Mastoparán puede activar a proteínas Gi/o no asociadas a m2AChR o

incrementar la actividad GTP-asa como fue descrito por Higachijima y col (75).

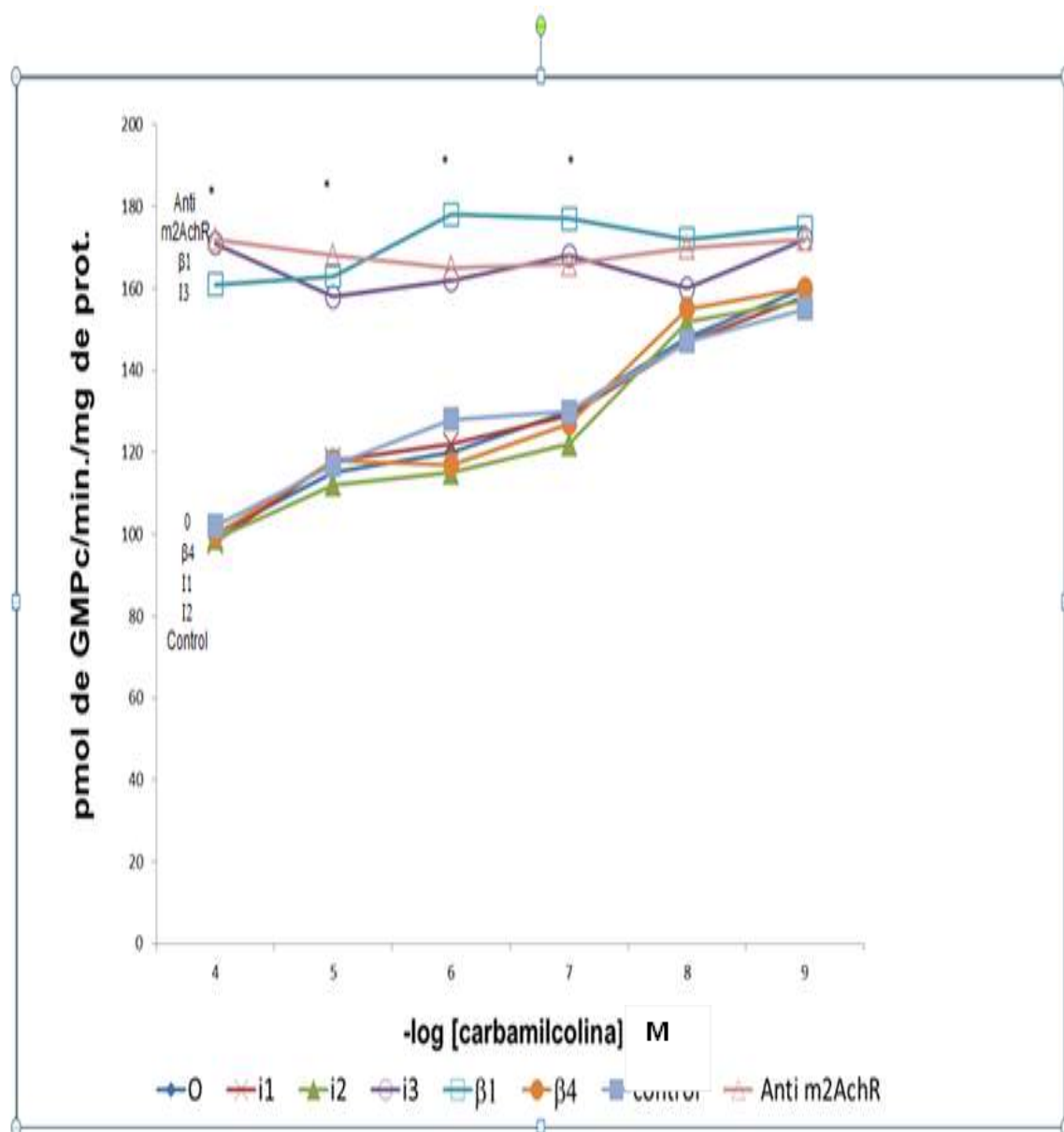


Figura 37. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 20''CC alquiladas con la mostaza 4 DAMP. Se procedió según Esquema 6 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

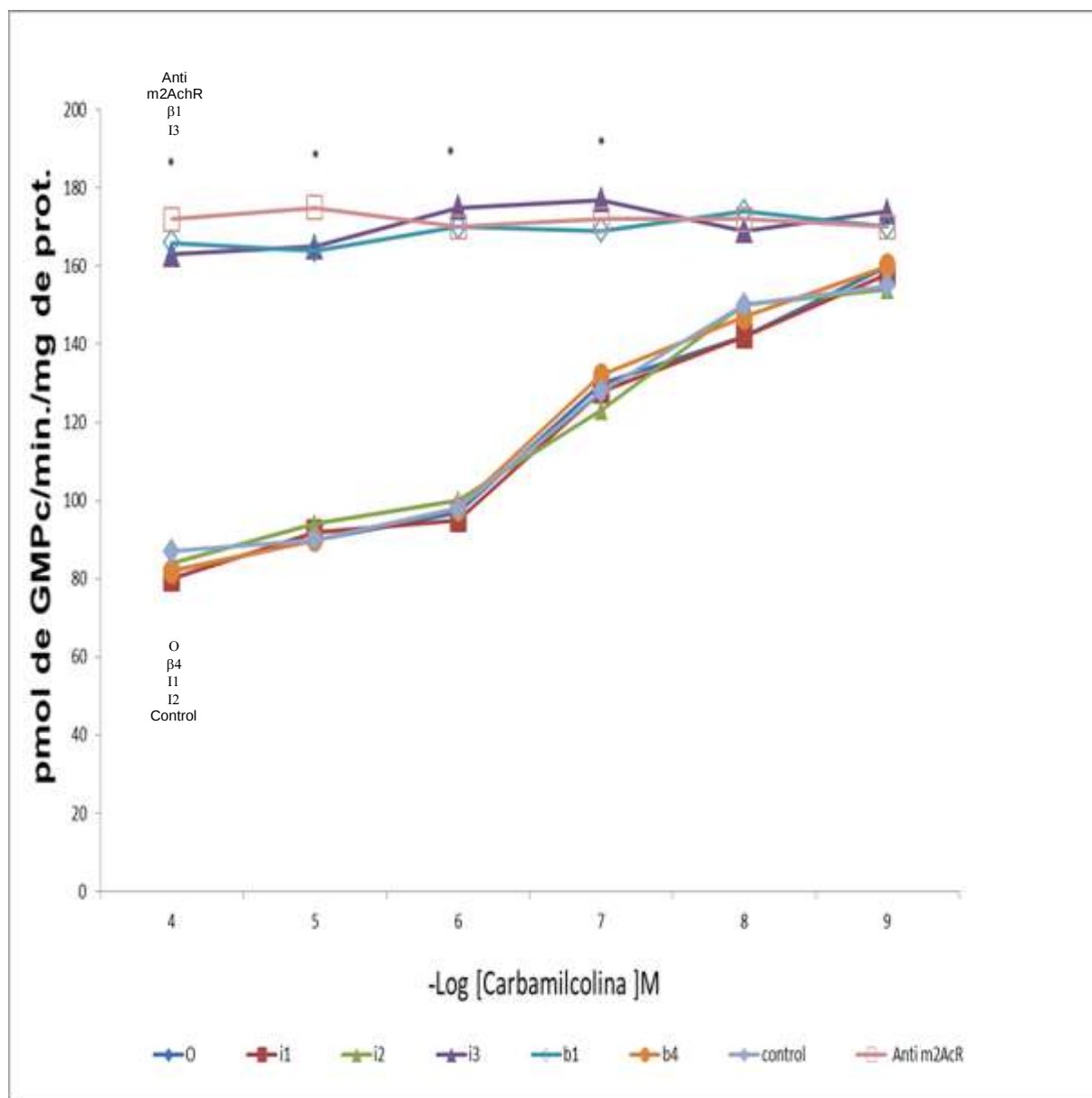


Figura 38. Efecto de los Anticuerpos anti-β o anti-αGi/o sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μM y Carbamilcolina en fracciones P1+P2 20''CC pre-incubadas con anticuerpos anti-m3AChR. Se procedió según Esquema 7 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

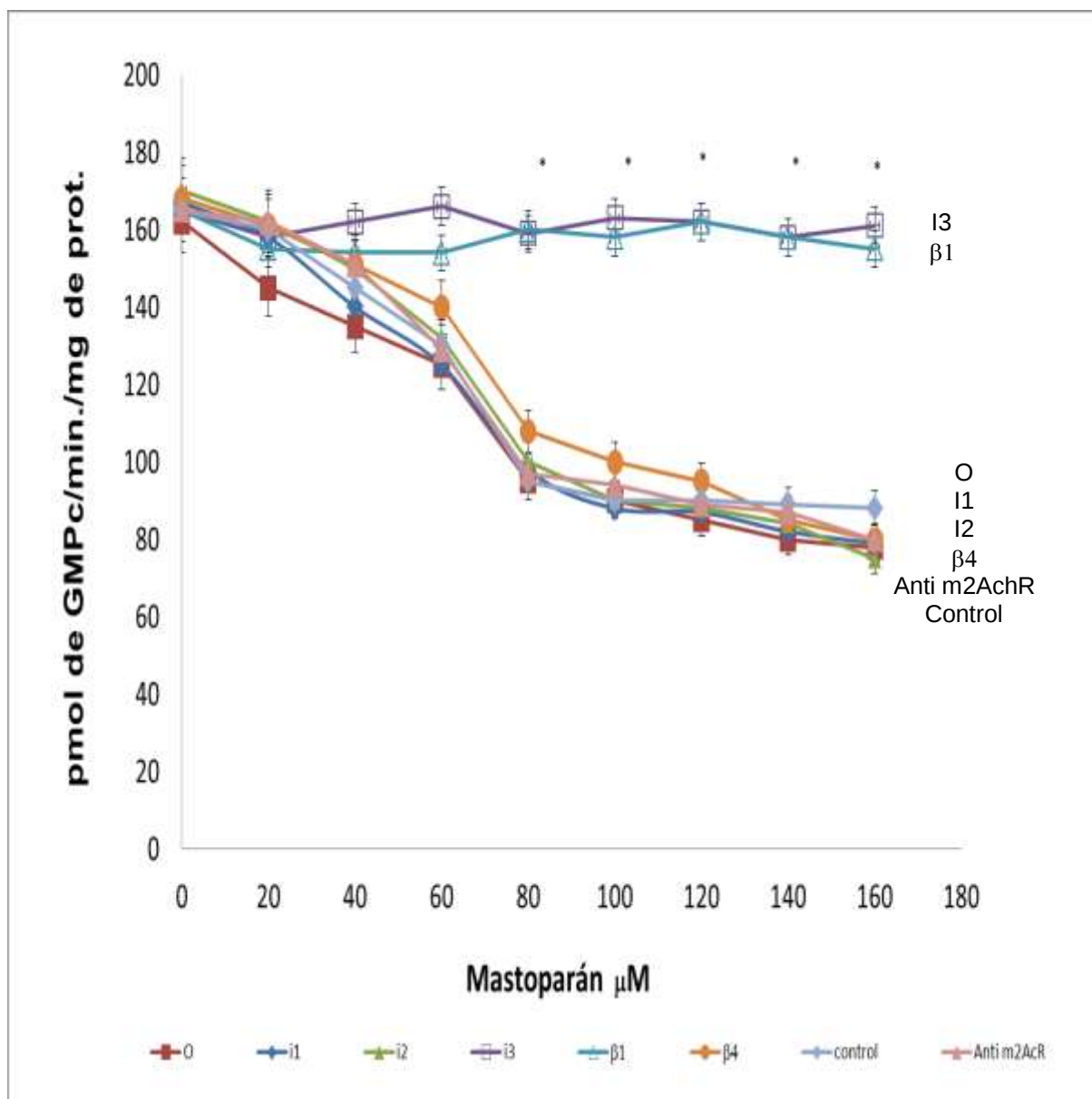


Figura 39. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Mastopar n en fracciones P1+P2 20''CC alquiladas con la mostaza 4-DAMP. Se procedió según Esquema 6 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm DS$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

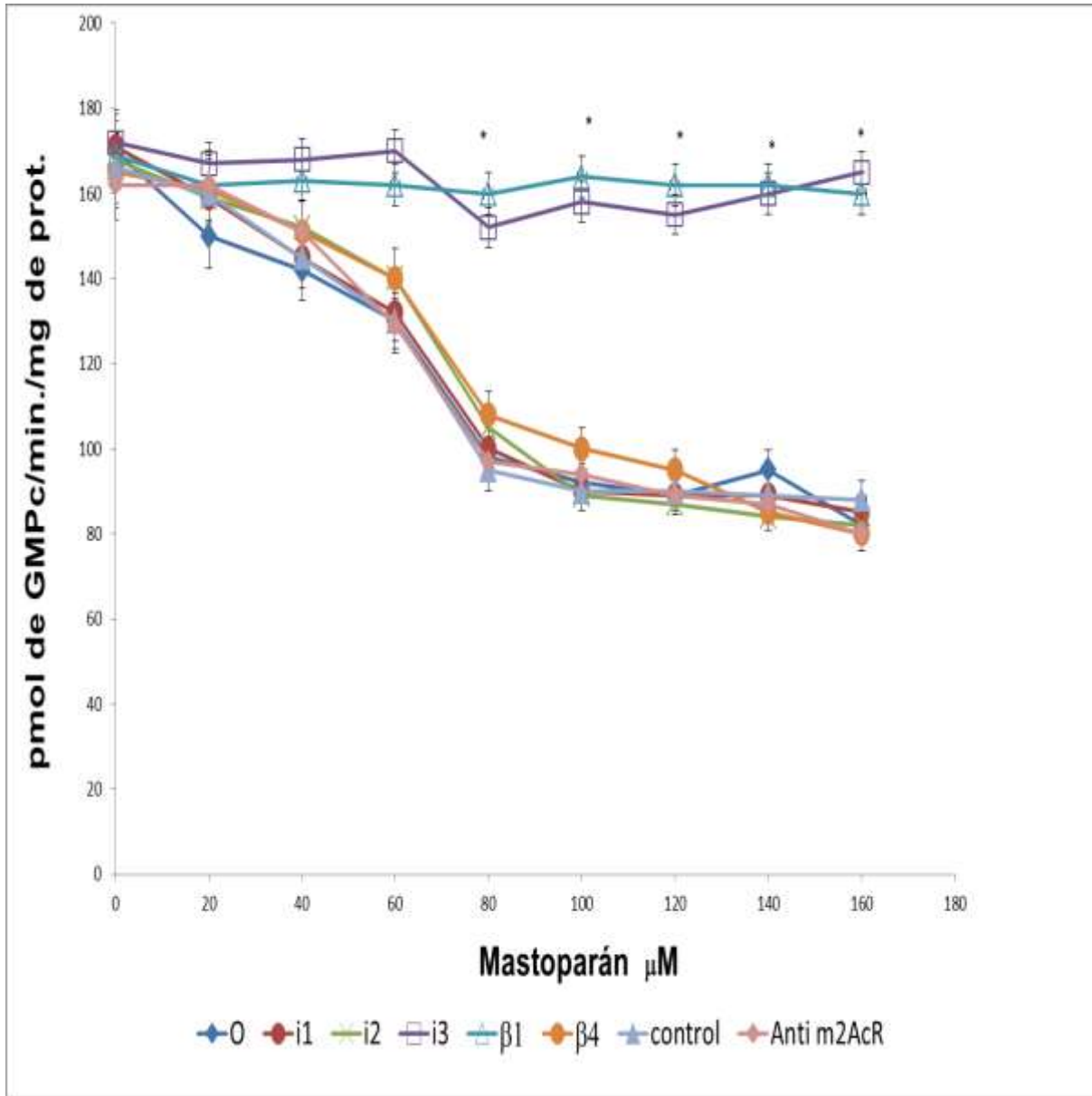


Figura 40. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- $\alpha\text{Gi}/\text{o}$ sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μM y Mastoparan en fracciones P1+P2 20''CC pre-incubadas con anticuerpos anti-m3AChR. Se procedió según Esquema 7 presentado en materiales y métodos, cada punto corresponde a $\bar{X} \pm \text{DS}$ de $n \geq 3$ (* $p < 0,05$).

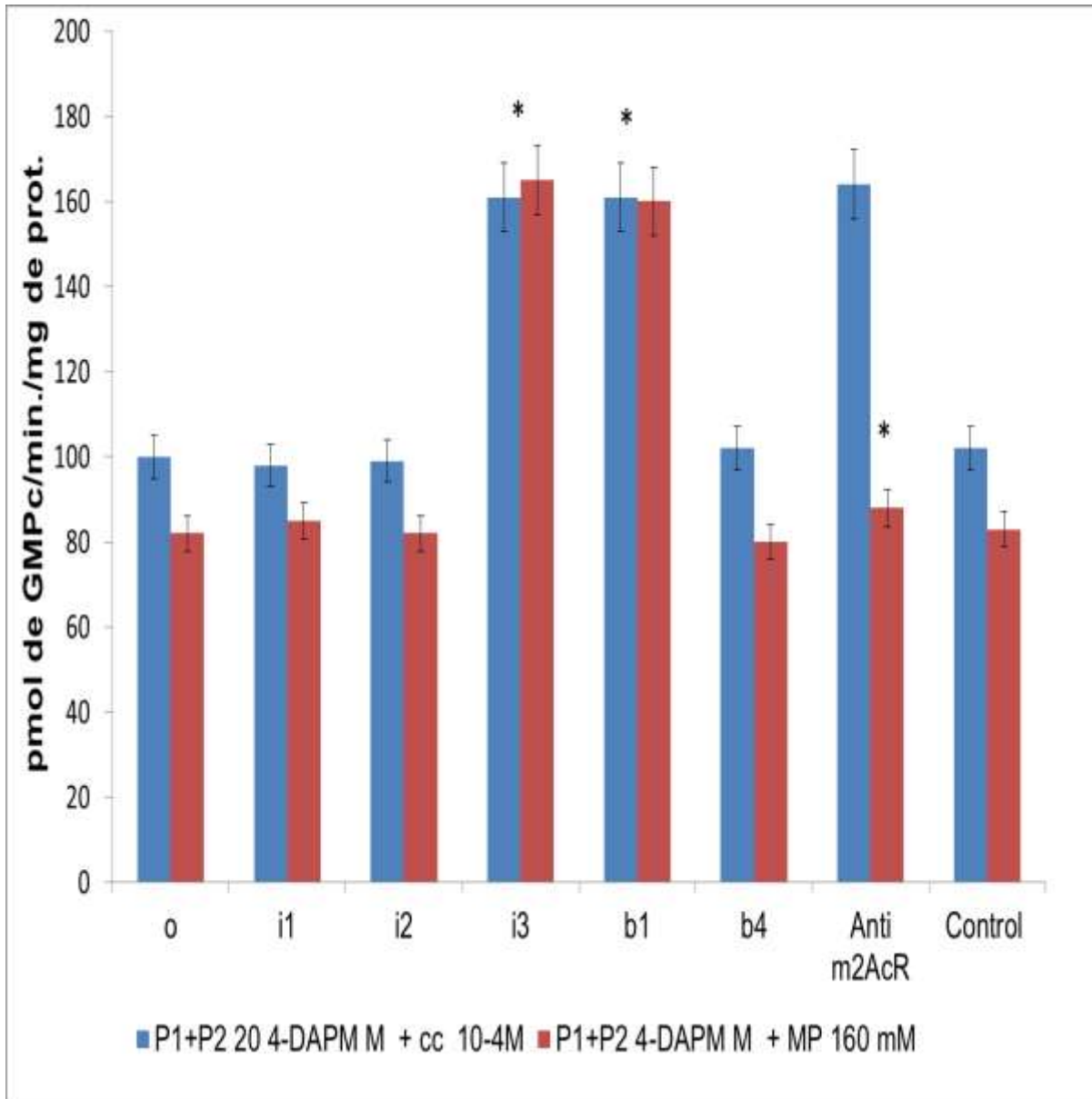


Figura 41. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina o Mastoparán a las máximas concentraciones en fracciones P1+P2 20''CC alquiladas con la mostazas 4-DAMP. Tomado de las Figuras 37 y 39 (* $p < 0,05$).

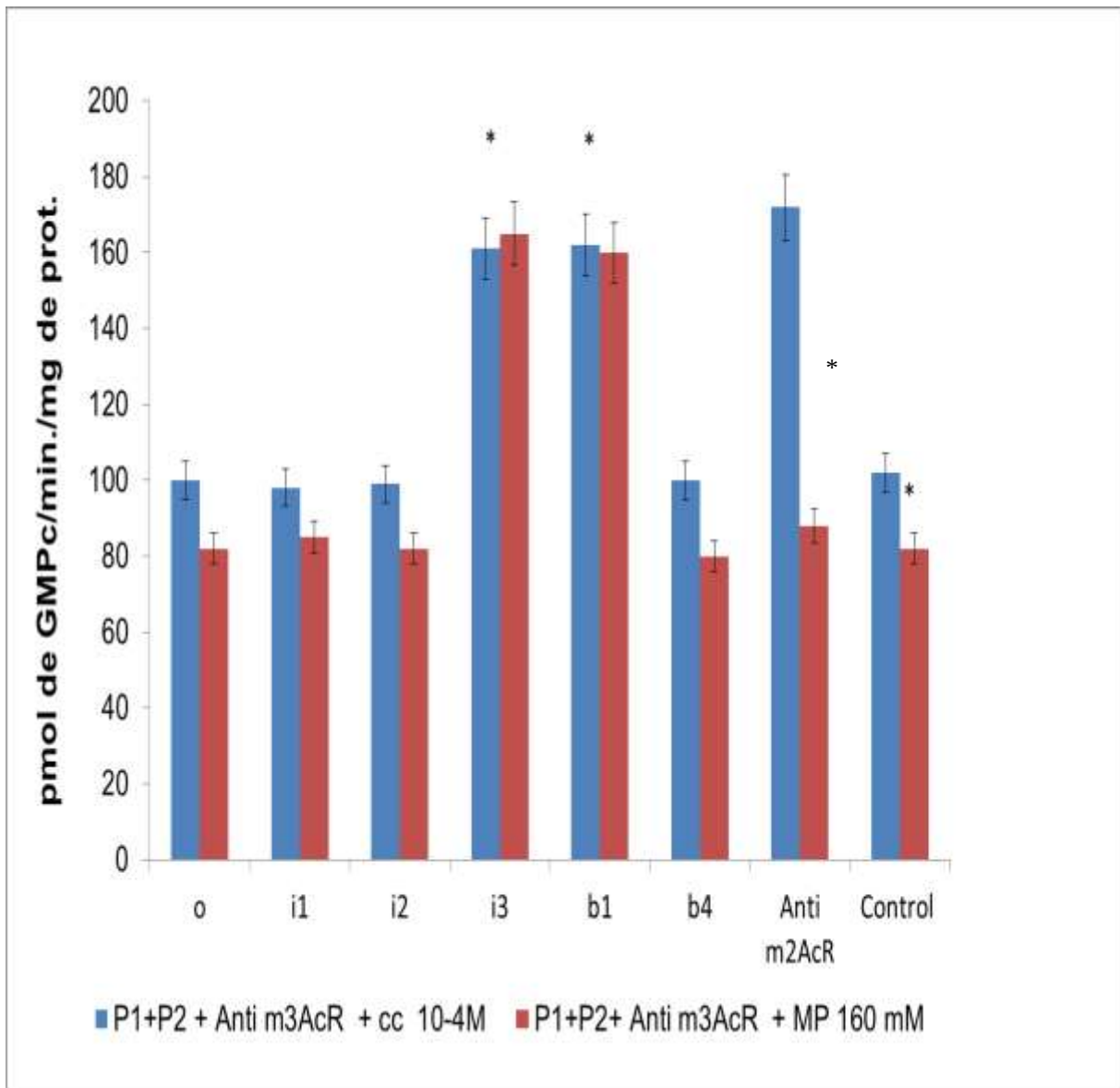


Figura 42. Efecto de los Anticuerpos anti- β o anti- α Gi/o sobre la actividad de la sGC estimulada por SNP 50 μ M y Carbamilcolina o Mastoparán a sus máximas concentraciones en fracciones P1+P2 20''CC pre-incubadas con anti-m3AChR. Tomado de las figuras 38 y 40 (* $p < 0,05$).

Tabla 9. DE₅₀ y % Máximo de Inhibición de las membranas P1+P2 20''CC en Condición Control.		
Membranas P1+P2 20''CC.	DE₅₀	% máximo de Inhibición
Mostaza 4-DAMP+ CC (-log)	6.8 M	40.5
Mostaza 4-DAMP + MP	55.2 µM	53.2
Anti-m3AChR+ CC(-log)	6.1M	34.2
Anti-m3AChR+ MP	55.5 µM	54.2

V. Discusión

5.1 Relación entre la producción de GMPc y la actividad contráctil del MLTB.

En el MLTB se han reportado dos respuestas celulares que son opuestas y que utilizan el GMPc como segundo mensajero, en este sentido observamos que:

1. La carbamilcolina activa a las GC a través de los mAChRs generando señales puntuales en el tiempo que son finamente reguladas por un conjunto de proteínas entre las que se encuentran las proteínas Gi/o activables por Mastoparén.
2. Por otra parte el CNP-53 y el SNP inducen respuestas acumulativas de GMPc en función del tiempo que disminuyen presuntamente por la acción de enzimas fosfodiesterasas y son también sensibles a Mastoparén.

De este hecho se puede generar una interrogante:

¿Cómo las células de MLTB pueden diferenciar entre las señales de GMPc que contraen y las señales de GMPc que relajan?

Como hemos visto en resultados anteriores, la estimulación del MLTB con el agonista muscarínico carbamilcolina conduce a la contracción muscular lisa lo que provoca un incremento en los niveles de GMPc en el músculo liso de las vías aéreas en forma de señales puntuales en el tiempo (73-74) Dichas elevaciones coinciden en el tiempo con la contracción inducida por carbamilcolina en el músculo liso traqueal de bovinos y su bloqueo conduce a una inhibición de la contracción. Tal como se observó en la inhibición de la contracción ejercida por ODQ y por el Mastoparén.

Por otra parte, los ligandos de las Guanililciclasas a saber, SNP (activador de la sGC), ANP y CNP (activadores de las NPR-GC) están asociados a la relajación del MLTB mediante la acumulación de GMPc en función del tiempo. Lo que evidencia claramente la existencia de dos patrones distintos de señalización, una señalización pulsátil como la activación muscarínica con aumentos de GMPc transitorios inferiores a 10 s, los cuales parecen ser altamente regulados y están relacionados a la contracción; mientras que los aumentos de GMPc inducidos con patrones acumulativos de GMPc como los observados por CNP y SNP, respectivamente parecen estar relacionados a la relajación del MLTB.

Ambos sistemas de señalización son inhibidos por la acción de Mastoparén, el cual es un activador inespecífico de las proteínas Gi/o, por lo cual se realizaron

los mismos diseños experimentales pre-incubando con la exotoxina de la *Bordetella pertussis* (PTX), la misma inactiva a las proteínas Gi/o a través de una reacción conocida como ADP-ribosilación, Esta toxina es una heteroproteína que consta de una estructura central conocida como S1 o protómero A que posee actividad ribosilasa y 5 estructuras de anclaje que favorecen la penetración celular que van de la S2 a la S5 a lo cual se le denomina oligómero B como observamos en la **Figura 43** (89-91).

Por otra parte la reacción de ADP-ribosilación ocurre en cuatro residuos de cisteína que se encuentran ubicados en el extremo carboxiterminal de la subunidades alfa de las proteínas Gi/o lo que hace que las proteína Gi/o se inactiven y por ende se desacople de su receptor asociado lo que genera una disrupción de las cascadas de señalización asociadas a esta familia de proteínas G (**Figura 44**) (89-91).

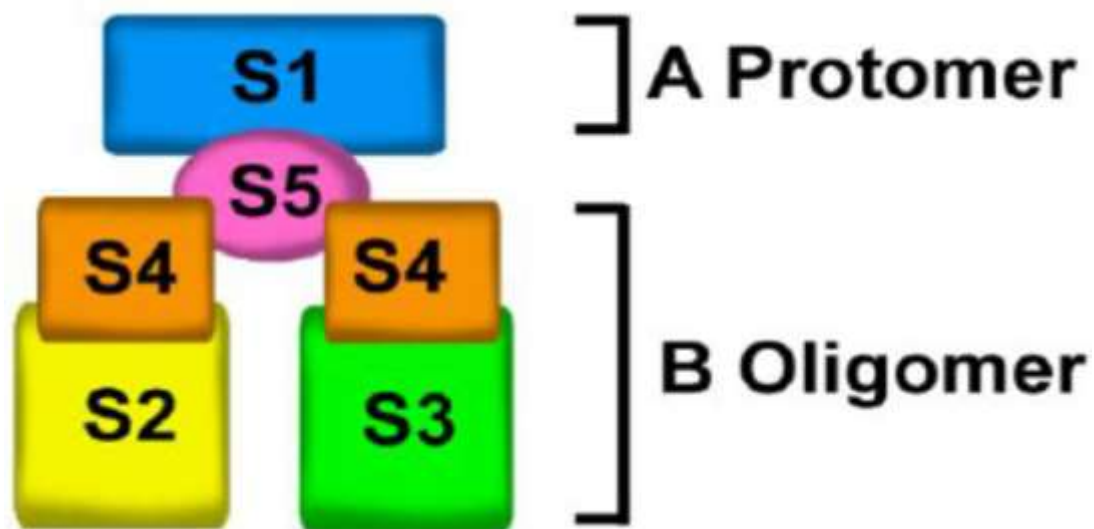


Figura 43. Estructura de la PTX: La PTX contiene 5 subunidades diferentes que están arregladas en una típica estructura A-B donde el protómero A que posee actividad catalítica se encuentra en un extremo de la proteína y el oligómero B contiene dos dímeros, el S2-S4 y el S3-S4 que se unen a la subunidad S5 los cuales se encuentran unidos a la pared celular de la *Bordetella pertussis* (91).

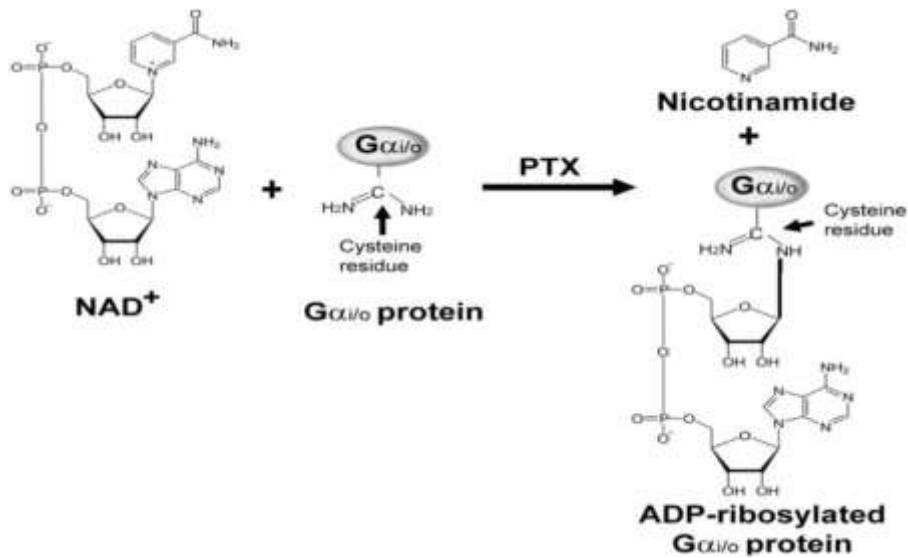


Figura 44. Diagrama esquemático de la ADP-ribosilación de la subunidad α de la proteína heterotrimérica Gi/o por la toxina pertussis (PTX). La PTX cataliza la escisión del enlace C-N entre un átomo de carbono de ribosa y un átomo de nitrógeno de nicotinamida, y transfiere el resto ADP-ribosilo (91).

En este trabajo observamos que la inactivación de las proteínas Gi/o revierte el efecto de Mastoparán lo que pone de manifiesto varios aspectos a saber:

1. Las proteínas Gi/o constituyen un sistema de proteínas que pueden regular la generación de GMPc por parte de α -Gq16 (37) y de una proteína G activadora de las sGC.
2. La activación de las proteínas Gi/o puede inhibir la contracción y las señales de GMPc; las cuales se revierten casi en su totalidad por acción de la PTX.

5.2 Efecto de Mastoparán a concentraciones crecientes sobre las señales de GMPc.

En trabajos anteriores se demostró que el Mastoparán ejerce un efecto inhibitorio sobre las señales de GMP generadas por carbamilcolina a los 20 y 60 s (82); sin embargo era importante estudiar la cinética de estas señales a concentraciones crecientes de Mastoparán lo cual evidenció que el Mastoparán es más efectivo sobre la segunda señal, la cual se inhibe en su totalidad a una concentración 50 nM, mientras que la primera señal solo se inhibe en un 59,6% con el doble de concentración de Mastoparán. Para comprender estos hallazgos es importante analizar el origen bioquímico de ambas señales:

1. La primera señal tiene su origen bioquímico en la activación colinérgica de la sGC, la cual según los hallazgos descritos por Uray y col. 2009 (72), puede anclarse al sarcolema del MLTB 20 s después de ser estimulada con carbamilcolina, esto ha sido descrito en otros sistemas biológicos por:
 - a. Balashova y col. (92) quienes demuestran que, la sGC se colocaliza con la Hsp-70 en la membrana de células HUVEC (Célula endotelial de la vena umbilical humana).
 - b. Linder y col. (93) quienes demuestran que la sGC puede migrar a la membrana y colocalizarse con las caviolinas-1 en endotelio de aorta de ratas.
 - c. Hochheiser y col. (94), demuestran que en la membrana lateral de unión de las células HEK 297 (human embrionic Kidney), se transloca el heterodímero de la sGC $\alpha_2\beta_1$, sobre el cual se producirán posteriormente, la formación de proteínas de unión celular como las conexina y la dimentinias.

Sin embargo es llamativo que a pesar de que las subunidades $\alpha_1\beta_1$ de la enzima sGC solo se encuentran en el sarcolema 20s después de la estimulación con carbamilcolina, la primera señal posee el doble de actividad enzimática que la segunda, lo que indicaría que una enzima que se ancla por un periodo muy corto

de tiempo a la membrana es más activa que la enzima que se encuentra presente de forma permanente en membrana.

Tomando en cuenta que Mastoparén, que es un péptido activador de las proteínas Gi/o (que no atraviesa el sarcolema), solo inhibe parcialmente esta enzima, se abre la posibilidad de explorar otras hipótesis que puedan explicar por qué la primera señal es mucho más activa que la segunda. En este particular Guerra de González y col. (73) postulan que la activación de sGC puede ocurrir posterior a un incremento del $[Ca^{2+}]_{ic}$ el cual es capaz de activar a la sGC, como ha sido descrito en neutrófilos para la sGC (95), la cual muestra una vía de activación directa independiente de NO capaz de incrementar cuatro veces la actividad de la sGC en presencia de Mg^{+2} . Dicho mecanismo es factible, ya que los agonistas muscarínicos, abren canales de Ca^{2+} acoplados a mAChRs que permiten la entrada de calcio desde el medio extracelular; adicionalmente, se ha demostrado que durante la activación muscarínica puede existir liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático, mediado por el IP_3 , el cual según Guerra de González y colaboradores incrementa en forma de picos después de la adición de carbamilcolina, el primero a los 10 s después de la adición de carbamilcolina (10 s antes de la primera señal de GMPc) y la segunda a los 80 s. De tal manera que estos dos sistemas de movilización de calcio pueden confluir para generar incrementos importantes de la $[Ca^{2+}]_{ic}$ lo cual podría estar vinculado a la activación de la sGC por mecanismos no dependientes de NO (96) **Figura 44-45.**

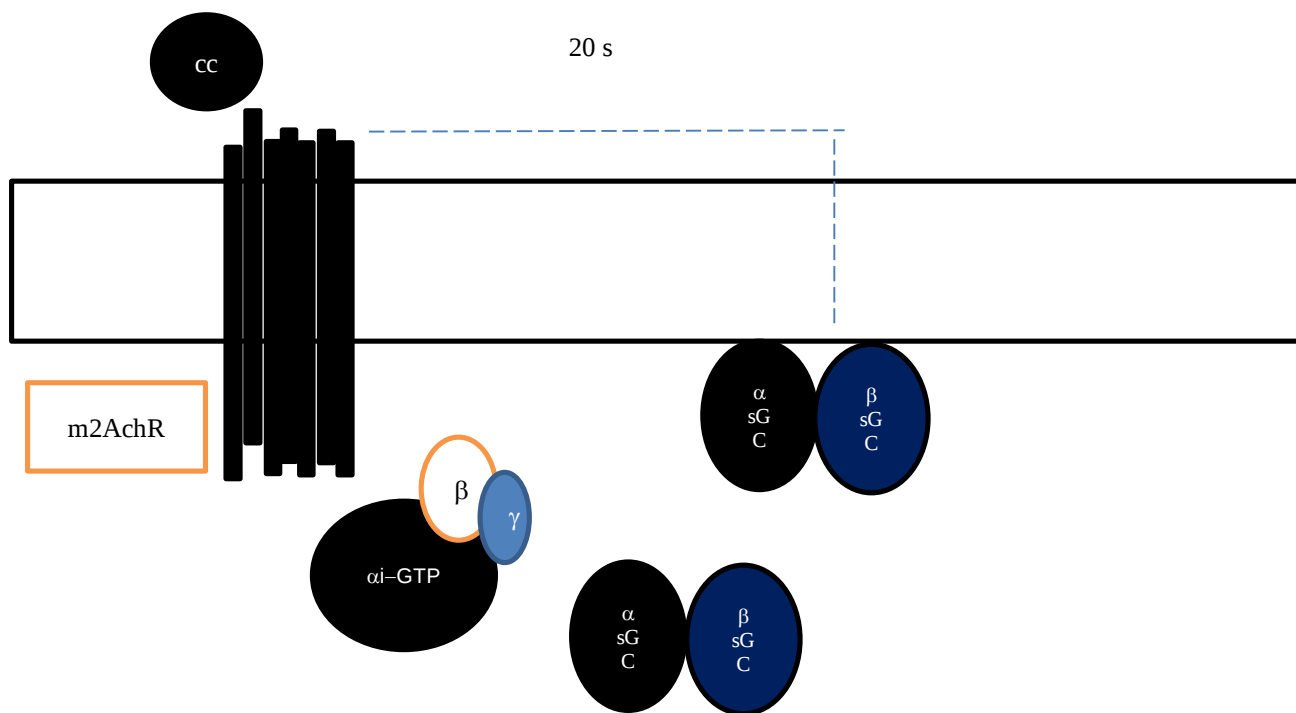


Figura 45. Modelo 1 en el que se observan el receptor muscarínico, las proteínas Gi/o y las sGC las cuales se translocan a la membrana 20 s después de añadida la carbamilcolina.

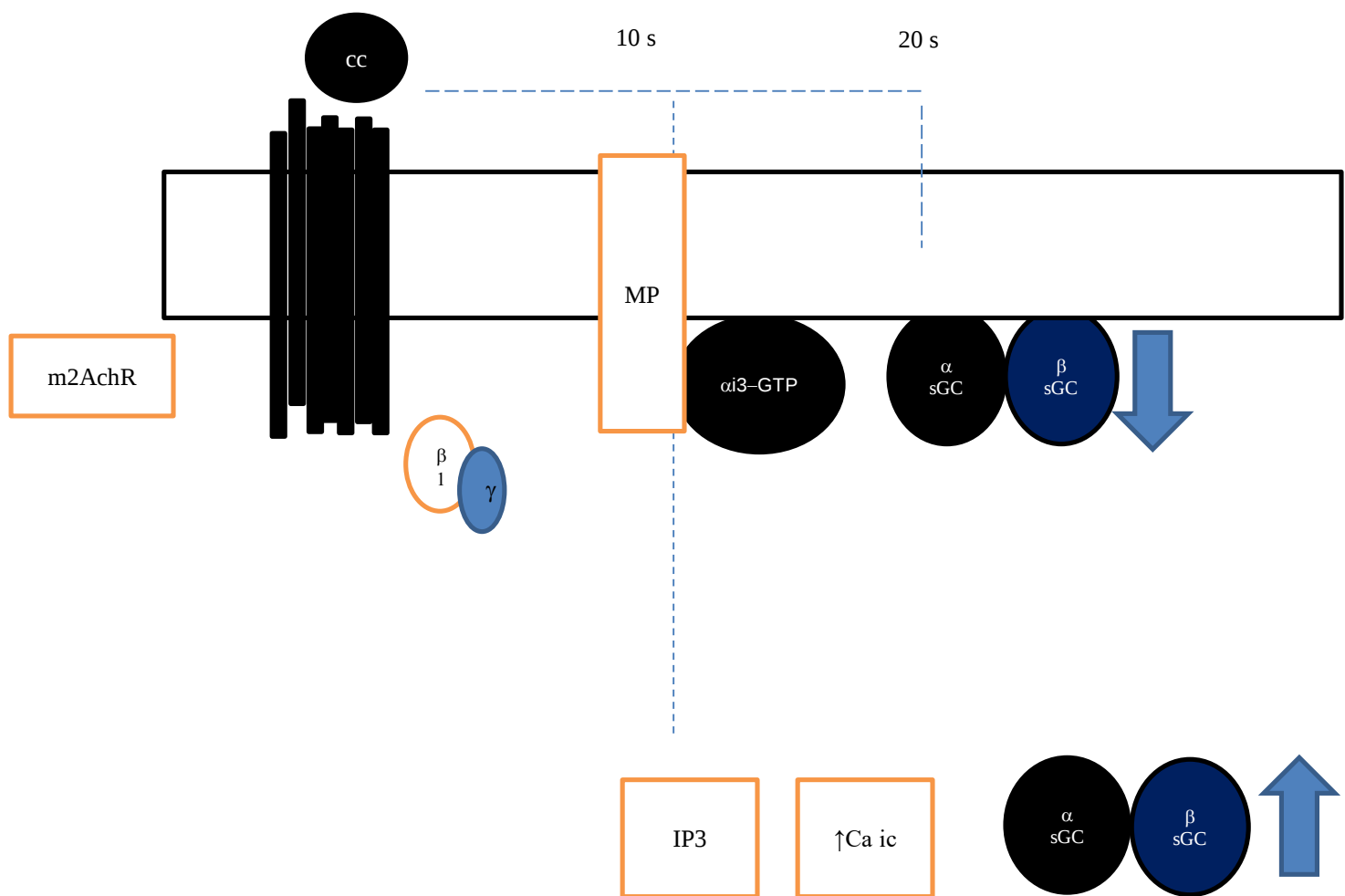


Figura 46. Modelo 2 en el que se observan el receptor muscarínico, las proteínas Gi/o activadas por Mastoparén, las sGC citosólica y translocadas a membrana 20 s después de añadida carbamilcolina. El modelo muestra que Mastoparén activa a las α -Gi3 de las cuales la α i3-GTP inhibe a las sGC que se transloca a la membrana. Adicionalmente, observamos que existe una señal de IP3 que aparece a los 10 s después de añadida carbamilcolina que puede ocasionar un aumento de calcio intracelular que podría activar a la sGC.

Otra hipótesis puede consistir, en una menor sensibilidad por parte de la sGC translocada a membrana a las proteínas Gi/o, lo cual es factible por el hecho que el % máximo de inhibición observado en membranas activadas con carbamilcolina o Mastoparén en membranas P1+P2 20''CC es aproximadamente

30% menor que el % máximo de inhibición observado en membranas P1+P2; lo que podría indicar una menor sensibilidad de las sGC a la acción de las proteínas Gi/o (**Figura 47**).

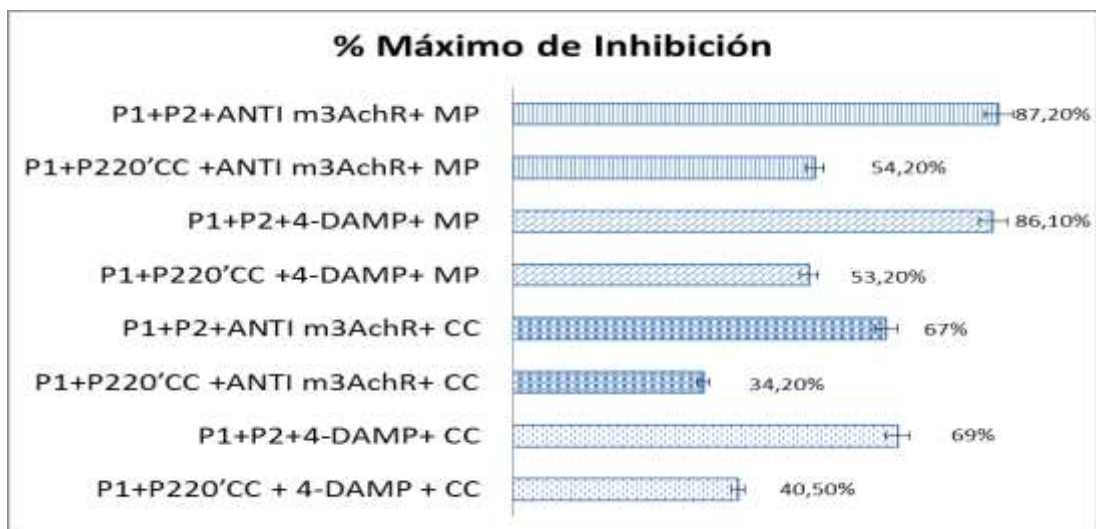


Figura 47. % Máximos de inhibición en fracciones P1+P2 y P1+P2 20''CC activadas con Carbamilcolina o Mastoparén y bloqueadas para el receptor m3AChR mediante alquilación o anticuerpos anti-m3AChR Tomado de las **Tablas 8 y 9**.

Sin embargo, a pesar de que ambas hipótesis son factibles las mismas no son excluyentes y podrían ser complementarias.

2. El origen bioquímico de la segunda señal es principalmente producto de la activación de la NPR-GC-B, que se identificó previamente en MLTB como la enzima GC con mayor actividad enzimática, la cual es activable por proteínas G heterotriméricas a través del dominio Yuxtamembrana (97). En los experimentos con músculo liso intacto observamos que Mastoparén es muchos más efectivo sobre esta enzima que sobre la sGC lo cual puede estar vinculado a que esta enzima está anclada a membrana de forma permanente lo que la puede hacer más sensibles a la acción de las proteínas Gi/o.

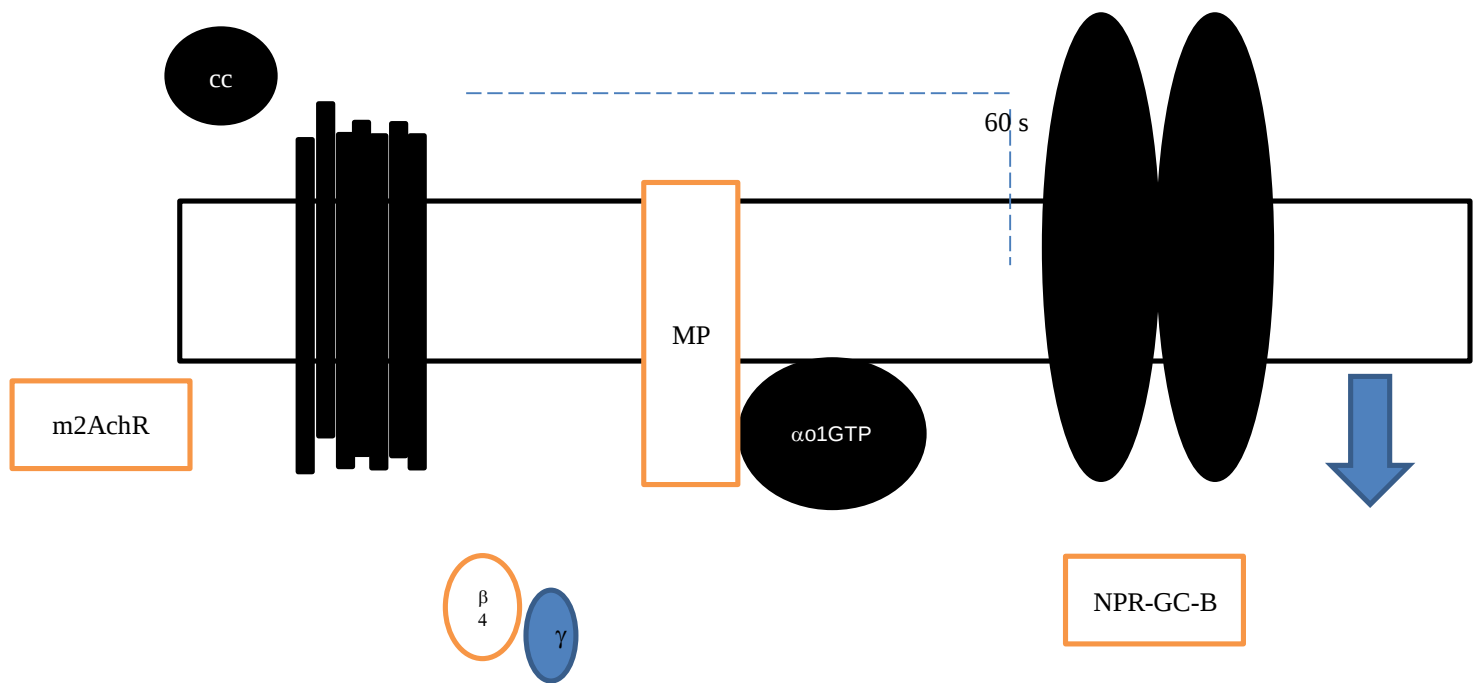


Figura 48. Modelo 3 en el que se observan el receptor muscarínico, las proteínas Gi/o activadas por Mastoparén y las NPR-GC-B. El modelo muestra que Mastoparén activa a las α -Gi de las cuales la $\alpha 01$ -GTP inhibe a las NPR-GC-B lo que hace que la señal a los 60 s con carbamilcolina desaparezca.

5.3 Posibles conformaciones heterotriméricas asociadas a m2AChR.

Una vez observado que en el MLTB intacto existe una importante señal proveniente de las proteínas Gi/o, la cual es capaz de inhibir la contracción del MLTB y bloquear las señales de GMPc, se realizaron experimentos en membrana los cuales se utilizaron para corroborar que esta inhibición procede de las proteínas Gi/o y detectar las posibles conformaciones heterotriméricas presentes en el MLTB; en este sentido realizamos una primera aproximación experimental, con péptidos carboxiterminales de las proteínas Gi/o los cuales han sido ampliamente utilizados como primera aproximación para tipificar proteínas G (37,98). En estos resultados, observamos que el único péptido que inhibe la activación de la NPR-GC-B en fracciones P1+P2 (**Figura 17**) de MLTB es el péptido α -Go1 por otra parte en membranas P1+P2 20"CC. (**Figura 18**) el único péptido que inhibe a la sGC es el péptido α -Gi3, posteriormente las membranas P1+P2 y P1+P2 20"CC alquiladas o bloqueadas con anticuerpos anti-m3AChR mostraron que estos mismos anticuerpos bloquean la inhibición observada en estas membranas cuando son expuestas a Carbamilcolina o con Mastoparán.

Por otra parte, en el diseño experimental los heterotrímeros se encuentran principalmente constituidos en estructuras α GDP- $\beta\gamma$, ya que la Carbamilcolina o el Mastoparán se añaden a las fracciones P1+P2 o P1+P2 20"CC en simultáneo con el CNP-53 o SNP, lo cual indica que el m2AChR, las proteína G y las GC (sGC o NPR-GC-B) se activan simultáneamente, por lo tanto el bloqueo que se observa con los anticuerpos anti- $\beta 4$ en las fracciones P1+P2 y anti- $\beta 1$ en la fracciones P1+P2 20"CC no necesariamente significa que estas proteínas inhiban a las NPR-GC-B o las sGC; y podría indicar que interfieren con la actividad GEF (GTP Exchange Factor) de estas subunidades, por lo tanto podemos suponer que los heterotrímeros que se encuentran acoplados a m2AChR que inhiben a las NPR-GC-B y sGC están conformados por las subunidades $\alpha 0\beta 4$ y $\alpha I\beta 1$ respectivamente.

En este trabajo no evaluamos las subunidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 5$ dado que para $\beta 2$ no se dispone de anticuerpos comerciales (posiblemente por su alta similitud estructural con $\beta 1$ las cuales solo difieren en 32 de los 340 aminoácidos que las componen) y las

subunidades β_3 y β_5 son subunidades asociadas a órganos de los sentidos y se expresan principalmente bajo variables truncadas (99-100). Por otra parte, motivos financieros no nos permitieron estudiar las subunidades γ ; sin embargo conocer las subunidad β acoplada a la subunidad Go1 o Gi3 nos aproxima a la subunidad γ , ya que su ubicación y su patrón de asociación con la subunidad β podría indicarnos cuales son las posibles subunidades γ capaces de asociarse a β_1 o a β_4 (**Tablas 2 y 3**).

En el caso de β_1 , las subunidades γ que pueden asociarse a esta subunidad son γ_2 o γ_6 (son la misma subunidad) γ_5 , γ_7 , γ_{10} γ_{11} , o γ_{12} , ya que el resto de las subunidades γ están asociadas a órganos de los sentidos o a otros tejidos, es de destacar que de estas subunidades la subunidad γ_{11} se une a membrana a través de un ácido graso Farnesílico de 15 carbonos y el resto se unen a la membranas a través de un isoprenoide geranilgeranil de 20 carbonos (99,101-104) por lo cual los posibles heterotrimeros conformados pueden ser: $\alpha\beta_1\gamma_2$, $\alpha\beta_1\gamma_5$, $\alpha\beta_1\gamma_7$, $\alpha\beta_1\gamma_{10}$, $\alpha\beta_1\gamma_{11}$ o $\alpha\beta_1\gamma_{12}$.

Por otra parte, los posibles heterotrimeros que inhiben a NPR-GC-B están constituidos por las subunidades γ , capaces de asociarse a β_4 y que puedan encontrarse en vías respiratorias; las cuales pueden ser γ_2 , γ_5 o γ_{12} , por lo cual los heterotrimeros que podrían estar asociados a la inhibición de NPR-GC-B pueden ser $\alpha\beta_4\gamma_2$, $\alpha\beta_4\gamma_5$ o $\alpha\beta_4\gamma_{12}$, los cuales se unen a la membranas a través de un isoprenoide geranilgeranil de 20 carbonos (99,101-104). Es importante mencionar que aunque no disponemos de un anticuerpo anti- α Go1 los resultados con los péptidos inhibitorios discriminan claramente que el extremo carboxiterminal inhibitor corresponde a la subfamilia Go1 y no Go2; por lo cual asumimos como posibles las configuraciones heterotriméricas antes mencionadas; sin embargo, este trabajo no nos permite descartar la existencia de otros heterotrimeros asociados a la inhibición de NPR-GC o sGC.

Como hemos mencionado anteriormente, las proteínas G se construyen a partir de una subunidad α , β y γ de las cuales, la subunidad α puede interactuar con el GDP

en su estado inactivo o con el GTP en la conformación activa. La interacción entre una proteína G heterotrimérica y un GPCR activo induce el intercambio de GDP / GTP en el subunidad $G\alpha$ (105-107) que hace que los switches (que son dominios cargados en la configuración inactiva) expongan regiones no polares y se pierda la unión por cargas que mantiene la configuración α -GDP $\beta\gamma$ generando una desestabilización concurrente de la interfaz entre α -GTP y el dímero $\beta\gamma$ (108) una vez reducida la unión por cargas, el desplazamiento de las proteínas α -GTP dependen de las interacciones hidrofóbicas; estas son asociaciones espontáneas que ocurren en búsqueda de un estado energéticamente favorable, donde se tenga la menor variación de energía libre (ΔG), en este sentido es importante mencionar que las proteínas Gi/o son irreversiblemente miristoladas (ácido grado de 14 carbonos) o reversiblemente palmitoladas (ácido grado de 16 carbonos). Lo anterior indica que probablemente las subunidades α_{o1} -GTP o α_{I3} -GTP se ubiquen en dominios menos hidrofóbicos cuando se encuentran unidas a GTP lo cual ha sido previamente descrito en otras proteínas Gi/o (109-113).

5.4 El Mastoparén, como activador directo de las proteínas Gi/o asociadas a la activación de la NPR-GC-B y sGC.

Este trabajo se realizó en fracciones de membrana P1+P2, las mismas fueron seleccionadas como modelo experimental ya que P1 es la fracción del sarcolema que posee mayor unión de L-³QNB (Quinuclidinyl benzilate) lo que indica una mayor abundancia de mAChRs (87) y P2 es la fracción del sarcolema que posee mayor actividad GC; por lo tanto, debido a que en el presente trabajo se estudió la actividad GC estimuladas directamente y desde los mAChRs utilizamos como modelo experimental la mezcla de ambas fracciones. Aunado a esto, adicionamos una variante que no había sido utilizada previamente, fue el fraccionamiento de membrana posterior a la incubación por 20 s con carbamilcolina lo que genera una fracción de membrana rica en actividad de la sGC activada con SNP lo cual corrobora los hallazgos de Uray y col. previamente descritos (72) (**Figuras 17, 18 y 27**) a esta fracción se le denominó P1+P2 20"CC y sirvió de modelo original para evaluar el efecto de las proteínas Gi/o sobre las sGC.

Con estos modelos experimentales, novedosos, practicamos la alquilación con mostaza 4-DAMP y el bloqueo con anticuerpos anti-m3AChR para generar membranas sin actividad del receptor m3AChR (**Figura 30**). Al no haber actividad del receptor m3AChR, la carbamilcolina y el Mastoparén se hacen inhibidores de la sGC y de la NPR-GC-B a través de las proteínas Gi/o identificadas en este trabajo, a saber $\alpha 1\beta 4$ y $\alpha 3\beta 1$.

En estos experimentos observamos varios aspectos a saber:

1. El Mastoparén es entre 15-20% más efectivo como activador de las proteínas Gi/o que carbamilcolina lo que significa que Mastoparén podría activar proteínas Gi/o que no están acopladas al receptor m2AChR que inhiben a las enzimas sGC y NPR-GC-B.

2. El empleo de Anticuerpos anti-m2AChR anula el efecto inhibitorio de carbamilcolina sobre las enzimas NPR-GC y sGC en membranas bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR y alquiladas con mostaza 4-DAMP .
3. El empleo de Anticuerpos anti-m2AChR no anula el efecto inhibitorio de Mastoparán sobre las enzimas NPR-GC y sGC en membranas alquiladas con mostaza 4-DAMP o bloqueadas con Anticuerpos anti-m3AChR, lo que indica que Mastoparán es capaz de activar a las proteínas Gi/o acopladas a m2AChR y explica porque Mastoparán inhibe selectivamente la señal muscarínica en tejido intacto.

5.5 Efecto de Mastoparén como mecanismo novedoso capaz de sortear la disfuncionalidad del receptor m2AChR.

Este trabajo muestra que a nivel del sarcolema del MLTB, Mastoparén es capaz de activar a las proteínas Gi/o acopladas al receptor m2AChR sin activar al receptor, lo cual observamos en el hecho de que ambas enzimas, tanto la sGC como la NPR-GC-B, resultan inhibidas por Mastoparén independientemente de la presencia de anticuerpo anti-m2AChR, lo que nos permite postular que de reproducirse este efecto *in vivo*, Mastoparén podría convertirse en un mecanismo novedoso, capaz de sortear la disfunción del receptor m2AChR y de esta forma restituir el efecto modulador de m2AChR sobre m3AChR en el MLVA y autoregulator de m2AChR sobre la liberación de ACh, mecanismo mediado por la activación de sus proteínas G asociadas, lo cual podría conllevar a una restitución del estado de permeabilidad de las vías aéreas, en cuadros que cursen con eosinofilia *in situ* .

VI. Conclusiones

1. El efecto de Mastoparán sobre las señales de GMPc es parcial sobre la sGC y total sobre las NPR-GC.
2. Existe un efecto modulador de las proteínas Gi/o sobre la contracción y los niveles de GMPc, lo que se evidencia con el incremento de este segundo mensajero en las señales a los 20 y 60 s, respectivamente y con el incremento en el porcentaje de contracción inducida por carbamilcolina en el MLTB en presencia PTX.
3. El efecto inhibitorio ejercido por Mastoparán es un efecto mediado por proteínas Gi/o, ya que tanto las señales de GMPc 20 y 60 s como la actividad contráctil se revierten significativamente cuando pre-incubamos con PTX.
4. Las enzimas sGC y las NPR-GC-B son sensibles a las acción de las proteínas Gi/o independientemente de que sus mecanismos de activación sean a través de ligandos específicos o receptores muscarínicos, ya que Mastoparán inhibe los niveles de GMPc inducidos por Carbamilcolina, SNP y CNP y este efecto es revertido por PTX.
5. Mastoparán activa a las proteínas Gi/o asociadas a la inhibición de las NPR-GC-B ($\alpha_1\beta_4$) y sGC ($\alpha_3\beta_1$), sin activar al receptor m2AChR.

VII. Agradecimientos

- Mi especial agradecimiento al Postgrado en Ciencias Fisiológicas dirigido magistralmente por la Dra. Zury Ana Domínguez y la Dra. Keybell Díaz.
- Mi especial agradecimiento a la Sra. Yelitza Bastidas, Secretaria del Postgrado en Ciencias Fisiológicas.
- Mi especial agradecimiento a la Dra. Ítala Lippo de Bécemberg por sus aportes significativos a mi tesis.
- Mi especial agradecimiento al Dr. Ernesto Trejo por su ayuda para el desarrollo del trabajo.
- Mi especial agradecimiento a la familia Parisca Mendoza por su hospitalidad.

VIII. Bibliografía

1. Kistemaker LE, Gosens R. Acetylcholine beyond bronchoconstriction: roles in inflammation and remodeling. *Trends Pharmacol Sci.* 2015; 36(3): 164-171. DOI: [10.1016/j.tips.2014.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.11.005) .
2. Arreola-Ramírez JL, Morales-Hernández PE, Falcón-Rodríguez CI y Segura-Medina P. Aspectos generales de la innervación pulmonar. *Gaceta Médica de México.* 2013; 149: 502-508. DOI: [10.1093/icb/icz002](https://doi.org/10.1093/icb/icz002) .
3. Cieri RL. Pulmonary Smooth Muscle in Vertebrates: A Comparative Review of Structure and Function. *Integr Comp Biol.* 2019; 59(1): 10-28. DOI: [10.1093/icb/icz002](https://doi.org/10.1093/icb/icz002) .
4. Gosens R, Zaagsma J, Meurs H and Halayko AJ. Muscarinic receptor signaling in the pathophysiology of asthma and COPD. *Respir Res.* 2006; 7(1): 73-88. DOI: [10.1186/1465-9921-7-73](https://doi.org/10.1186/1465-9921-7-73) .
5. Katritch V, Cherezov V and Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; 53:531-556. DOI: [10.1146 / annurev-pharmtox-032112-135923](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923) .
6. Meurs H, Dekkers BG, Maarsingh H, Halayko AJ, Zaagsma J and Gosens R. Muscarinic receptors on airway mesenchymal cells: novel findings for an ancient target. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013; 26(1): 145-155. DOI: [10.1016/j.pupt.2012.07.003](https://doi.org/10.1016/j.pupt.2012.07.003) .
7. Roffel A, Elzinga C and Zaagsma J. Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol.* 1990; 3(1): 47-51. DOI: [10.1016/0952-0600\(90\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0952-0600(90)90009-8) .

8. Maeda A, Kubo M, Mishina M, and Numa S. Tissue distribution of mRNAs encoding muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *FEBS Lett.* 1998; 239(2): 339-342. DOI: [10.1016/0014-5793\(88\)80947-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80947-5) .
9. Fisher JT, Vincent SG, Gomeza J, Yamada M and Wess J. Loss of vagally mediated bradycardia and bronchoconstriction in mice lacking M2 or M3 muscarinic acetylcholine receptors. *FASEB J.* 2004; 18(6): 711–713. DOI: [10.1096/fj.03-0648fje](https://doi.org/10.1096/fj.03-0648fje) .
10. Elbon CL, Jacoby DB and Fryer AD. Pretreatment with an antibody to interleukin-5 prevents loss of pulmonary M2 muscarinic receptor function in antigen-challenged guinea pigs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995; 12(3): 320–328. DOI: [10.1165/ajrcmb.12.3.7873198](https://doi.org/10.1165/ajrcmb.12.3.7873198) .
11. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM and Dominici F. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987–2000. *Jama.* 2004; 292(19): 2372–2378. DOI: [10.1001/jama.292.19.2372](https://doi.org/10.1001/jama.292.19.2372) .
12. Shaffo FC, Grodzki AC, Fryer AD, Lein PJ. Mechanisms of organophosphorus pesticide toxicity in the context of airway hyperreactivity and asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2018; 315(4): L485-L501 DOI: [10.1152/ajplung.00211.2018](https://doi.org/10.1152/ajplung.00211.2018) .
13. Jacoby DB, Xiao HQ, Lee NH, Chan-Li Y and Fryer AD. Virus- and interferon-induced loss of inhibitory M2 muscarinic receptor function and gene expression in cultured airway parasympathetic neurons. *J Clin Invest.* 1998; 102(1): 242-248. DOI: [10.1172/JCI11114](https://doi.org/10.1172/JCI11114) .
14. Drake MG, Lebold KM, Roth-Carter QR, Pincus AB, Blum ED, Proskocil BJ, Jacoby DB, Fryer AD and Nie Z. Eosinophil and airway nerve interactions in asthma. *J Leukoc Biol.* 2018; 104(1): 61-67. DOI: [10.1002/JLB.3MR1117-426R](https://doi.org/10.1002/JLB.3MR1117-426R) .

15. Ishida KL, Kell J, Thomson RJ, Beattie LL, and Schellenberg RR. Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea-pigs. *J. Appl. Physiol.* 1989; 67(3): 1133-1139. DOI: [10.1152/jappl.1989.67.3.1133](https://doi.org/10.1152/jappl.1989.67.3.1133) .
16. Belmonte KE, Fryer AD and Costello RM. Role of insulin in antigen-induced airway eosinophilia and neuronal M2 muscarinic receptor dysfunction. *J Appl Physiol* 1998; 85(5): 1708–1718. DOI: [10.1152/jappl.1998.85.5.1708](https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.5.1708) .
17. Costello RW, Schofield BH, Kephart GM, Gleich GJ, Jacoby DB and Fryer AD. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal m2 muscarinic receptor function. *Am J Physiol.* 1995; 273 (1Pt1): L93–L103. DOI: [10.1152/ajplung.1997.273.1.L93](https://doi.org/10.1152/ajplung.1997.273.1.L93) .
18. Evans CM, Jacoby DB, and Fryer AD. Effects of dexamethasone on antigen induced airway eosinophilia and M2 receptor dysfunction. *Am J Respir Crit CareMed.* 2001; 163(6): 1484–1492. DOI: [10.1164/ajrccm.163.6.2007047](https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.2007047) .
19. Jacoby DB, Gleich GJ and Fryer AD. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin. Invest.* 1993; 91(4): 1314–1318. DOI: [10.1172/JCI116331](https://doi.org/10.1172/JCI116331) .
20. Gulbenkian AR, Fernandez X, Kreutner W, Minniccozz M, Watnick T, Kung and Egan RW. Anaphylactic challenge causes eosinophil accumulation in bronchoalveolar lavage fluid guinea pigs: modulation by betamethasone, phenidione, indomethacin, WEB 2086, and a novel antiallergy agent, SCH 37224. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 142(3): 680-685. DOI: [10.1164/ajrccm/142.3.680](https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.3.680) .
21. Ishida KL, Kell J, Thomson RJ, Beattie LL, and Schellenberg RR. Repeated antigen challenge induces airway hyperresponsiveness with tissue eosinophilia in guinea-pigs. *J. Appl. Physiol.* 1989; 67(3): 1133-1139. DOI: [10.1152/jappl.1989.67.3.1133](https://doi.org/10.1152/jappl.1989.67.3.1133) .

22. Ten RM, Pease LR, McKean DJ, Bell MP and Gleich GJ. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase. Evidence for the existence of a peroxidase multigene family. *J. Exp. Med.* 1989; 169(5): 1757-1769. DOI: [10.1084/jem.169.5.1757](https://doi.org/10.1084/jem.169.5.1757) .
23. Barker RL, Ten RM, Loegering DA, Hamann KJ, Pease LR, and Gleich GJ. Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J. Immunol.* 1989; 143(3): 952-955.
24. Gies JP, Bertrand C, Vanderheyden P, Waeldele F, Dumont P, .Pauli G, and Landry Y. Characterization of muscarinic receptors in human, guinea pig and rat lung. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1989; 250(1): 309-315.
25. Peterson GL, Rosenbaum LC, Broderick DJ, and Schimerlik GL. Physical properties of the purified cardiac muscarinic acetylcholine receptor. *Biochemistry.* 1986; 25(11): 3189-3202. DOI: [10.1021/bi00359a017](https://doi.org/10.1021/bi00359a017) .
26. Kubo T, Sukuda A, Mikami A, Maeda H, Takahashi M, Mishina, T. Haga K, Haga A, Ichiyama K, Kangawa M, Kojima H, Matsuo T, Hirose T and Numa S. Cloning sequencing, and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature.* 1986; 323(6087): 411-416. DOI: [10.1038/323411a0](https://doi.org/10.1038/323411a0) .
27. Ladinsky H, Giraldo E, Monferini G, Schiavi M, Vigano L, DeConti R, Micheletti R, and Hammer R. Muscarinic receptor heterogeneity in smooth muscle: binding and functional studies with AF-DX 116. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988; 9(Suppl.): 44-48.
28. Jacoby D, Gleich G, and Fryer A. Human eosinophil major basic protein is an endogenous allosteric antagonist at the inhibitory muscarinic M2 receptor. *J Clin Invest.* 1993; 91(4): 1314–1318. DOI: [10.1172/JCI116331](https://doi.org/10.1172/JCI116331) .

29. Coulson FR and Fryer AD. Muscarinic acetylcholine receptors and airway diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 98(1): 59–69. DOI: [10.1016/s0163-7258\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(03)00004-4) .
30. Oldham W and Hamm H. How do receptors activate G proteins?. *Adv Protein Chem*. 2007; 74: 67-93. DOI: [10.1016/S0065-3233\(07\)74002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(07)74002-0) .
31. Oldham W and Hamm H. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Q Rev Biophys*. 2006; 39: 117-166. DOI: [10.1017/S0033583506004306](https://doi.org/10.1017/S0033583506004306) .
32. Rens-Domiano S and Hamm H. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB J*. 1995; 9(11): 1059-1066. DOI: [10.1096/fasebj.9.11.7649405](https://doi.org/10.1096/fasebj.9.11.7649405) .
33. Lambright D, Noel J, Hamm H and Sigler P. Structural determinants for activation of the alpha-subunit of a heterotrimeric G protein. *Nature*. 1994; 369 (6482): 621-628. DOI: [10.1038/369621a0](https://doi.org/10.1038/369621a0) .
34. Mixon M, Lee E, Coleman D, Berghuis A, Gilman A and Sprang S. Tertiary and quaternary structural changes in Gi alpha 1 induced by GTP hydrolysis. *Science*. 1995; 270 (5238): 954-960. DOI: [10.1126/science.270.5238.954](https://doi.org/10.1126/science.270.5238.954) .
35. Skiba A, Bae H and Hamm H. Mapping of effector binding sites of transducin alpha-subunit using G alpha t/G alpha i1 chimeras. *J Biol Chem*. 1996; 271(1): 413-424. DOI: [10.1074/jbc.271.1.413](https://doi.org/10.1074/jbc.271.1.413) .
36. Sunahara R, Dessauer C, Whisnant R, Kleuss C and Gilman A. Interaction of Gsalpha with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*. 1997; 272(35): 22265-22271. DOI: [10.1074/jbc.272.35.22265](https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22265) .
37. Bruges G, Borges A, Sanchez de Villarroel S, Lippo de Becemberg I, de Toba G, Placeres F, Gonzalez de Alfonso R and Alfonso M. Coupling of M₃ Acetylcholine Receptor to Gq16 Activates a Natriuretic Peptide Receptor Guanylyl Cyclase.

Journal of Receptors and Signal Transduction. 2007; 27(2-3): 189–216.
DOI: [10.1080/10799890701417899](https://doi.org/10.1080/10799890701417899) .

38. Zhang F and Casey P. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. Annu Rev Biochem. 1996; 65: 241–269. DOI: [10.1146/annurev.bi.65.070196.001325](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001325) .

39. Milligan G and Grassie M. How do G proteins stay at the plasma membrane?. Essays Biochem. 1997; 32: 49–60.

40. Duc N, Kim H and Chung K. Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. European Journal of Pharmacology. 2015; 763 (Pt B): 214–222. DOI: [10.1016/j.ejphar.2015.05.016](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.05.016) .

41. Kozasa T. Mechanism of beta-gamma effector interaction. Handbook of Cell Signaling, Academia Press. 2004; 639–643.

42. Robishaw J. Specificity of G protein betagamma dimer signaling. Handbook of Cell Signaling, Academia Press. 2004; 623–629.

43. Dingus J, Wells C, Campbell L, Cleator J, Robinson K, and Hildebrandt J. G Protein $\beta\gamma$ Dimer Formation: $G\beta$ and $G\alpha$ Differentially Determine Efficiency of in Vitro Dimer Formation. Biochemistry. 2005; 44(35): 11882–11890. DOI: [10.1021/bi0504254](https://doi.org/10.1021/bi0504254) .

44. McIntire WE. Structural Determinants Involved in the Formation and Activation of G Protein $\beta\gamma$ Dimers. Neurosignals. 2009; 17(1): 82–99. DOI: [10.1159/000186692](https://doi.org/10.1159/000186692) .

45. Yan K, Kalyanaraman V and Gautam N. Differential ability to form the G protein betagamma complex among members of the beta and gamma subunit families. J Biol Chem. 1996; 271(12): 7141–7146. DOI: [10.1074/jbc.271.12.7141](https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.7141) .

46. Schmidt C, Thomas T, Levine M, and Neer E. Specificity of G protein beta and gamma subunit interactions. *J Biol Chem.* 1992; 267(20): 13807–13810.
47. Ray K, Kunsch C, Bonner L and Robishaw J. Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem.* 1995; 270(37): 21765–21771. DOI: [10.1074/jbc.270.37.21765](https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21765) .
48. Pronin A and Gautam N. Interaction between G-protein beta and gamma subunit types is selective. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(13): 6220–6224. DOI: [10.1073/pnas.89.13.6220](https://doi.org/10.1073/pnas.89.13.6220) .
49. Lee C, Murakami T and Simonds W. Identification of a discrete region of the G protein gamma subunit conferring selectivity in beta gamma complex formation. *J Biol Chem.* 1995; 270(15): 8779–8784. DOI: [10.1074/jbc.270.15.8779](https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8779)
50. Mervine S, Yost E, Sabo J, Hynes T and Berlot C. Analysis of G protein betagamma dimer formation in live cells using multicolor bimolecular fluorescence complementation demonstrates preferences of beta1 for particular gamma subunits. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(1): 194–205. DOI: [10.1124/mol.106.022616](https://doi.org/10.1124/mol.106.022616) .
51. Roskopf D, Koch K, Habich C, Geerdes J, Ludwig A, Wilhelms S, Jakobs KH and Siffert W. Interaction of Gbeta3s, a splice variant of the G-protein Gbeta3, with Ggamma - and Galpha-proteins. *Cell Signal.* 2003; 15(5): 479–488. DOI: [10.1016/s0898-6568\(02\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00140-7) .
52. Asano T, Morishita R, Ueda H and Kato K. Selective association of G protein beta (4) with gamma (5) and gamma (12) subunits in bovine tissues. *J Biol Chem.* 1999; 274(30): 21425– 21429. DOI: [10.1074/jbc.274.30.21425](https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21425) .

53. Roskopf D, Nikula C, Manthey I, Joisten M, Frey U, Kohnen S and Siffert W. The human G protein beta4 subunit: gene structure, expression, Ggamma and effector interaction. *FEBS Lett.* 2003; 544(1-3): 27–32. DOI: [10.1016/s0014-5793\(03\)00441-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00441-1) .
54. Jones M and Garrison J. Instability of the G-protein beta5 subunit in detergent. *Anal Biochem.* 1999; 268(1): 126-133. DOI: [10.1006/abio.1998.3064](https://doi.org/10.1006/abio.1998.3064) .
55. Yost E, Mervine S, Sabo J, Hynes T and Berlot C. Live cell analysis of G protein beta5 complex formation, function, and targeting. *Mol Pharmacol.* 2007; 72(4): 812–825. DOI: [10.1124/mol.107.038075](https://doi.org/10.1124/mol.107.038075) .
56. Goldberg N, Haddox M, Nicol S, Glass D, Sandord C, Kuehl F and Stensen R. Biologic Regulation Through Opposing Influences of Cyclic GMP and Cyclic AMP: The Yin Yang Hypothesis. *Advances in Cyclic Nucleotide Research.* 1975; 5: 307-330.
57. Pype J, Mak J, Dupont M, Verleden G and Barnes P. Desensitization of the histamine H1-receptor and transcriptional down-regulation of histamine H1-receptor gene expression in bovine tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1998; 125: 1477-1484. DOI: [10.1038/sj.bjp.0702222](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702222) .
58. Zhou H and Torphy T. Relationship between cyclic guanosine monophosphate accumulation and relaxation of canine tracheal is induced by nitrovasodilators. *J. Pharmacol Exp Ther.* 1991; 258: 972-978.
59. Lucas K, Pitari C, Kazcrounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik K, and Waldman S. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(3): 375-413.
60. Dove S. Mammalian Nucleotidyl Cyclases and Their Nucleotide Binding Sites. *Handb Exp Pharmacol.* 2017; 238: 49-66. DOI: [10.1007/164_2015_34](https://doi.org/10.1007/164_2015_34) .

61. Kuhn M. Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev.* 2016; 96(2):751-804. DOI: [10.1152 / physrev.00022.2015](https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2015) .
62. Nakahara T, Yunoki M, Mitani A, Sakamoto K and Ishii K. Stimulation of muscarinic M₂ receptors inhibits atrial natriuretic peptide-mediated relaxation in bovine tracheal smooth muscle. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2002; 366(4): 376-379. DOI: [10.1007 / s00210-002-0623-1](https://doi.org/10.1007/s00210-002-0623-1) .
63. Borges A, Sánchez de V, Winand N, Lippo de Becemberg I, Alfonzo M and González de Alfonzo R. Molecular and Biochemical Characterization of a CNP-sensitive Guanylyl Cyclase in Bovine Tracheal Smooth Muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 25(1): 98-103. DOI: [10.1165 / ajrcmb.25.1.4395](https://doi.org/10.1165/ajrcmb.25.1.4395) .
64. Alfonzo MJ, Guerra de GL, Sánchez de YS, Francis de TG, Mistle A, Napoleón de HY, Gonzalez de Alfonzo R and Lippo de Becemberg I. Signal transduction pathways through mammalian guanylyl cyclases. *New Advances in Cardiovascular Physiology and Pharmacology.* 1998; 147-75.
65. Ignarro L, Ballot B and Wood K. Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. *J Biol Chem.* 1984; 259 (10): 6201-6207.
66. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D and Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-yl a Heme-site inhibitor of Nitric Oxide sensitive Guanylyl cyclase. *Mol Pharmacology.* 1996; 50(1): 1-5.
67. Papapetropoulos A, Simoes D, Xanthou G, Roussos C and Gratziau C. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 290(1): L179–L184. DOI: [10.1152 / ajplung.00330.2005](https://doi.org/10.1152/ajplung.00330.2005) .

68. Gupta G, Azam M, Yang L and Danziger RS. The $\beta 2$ subunit inhibits stimulation of the $\alpha 1/\beta 1$ form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1488–1492. DOI: [10.1172/JCI119670](https://doi.org/10.1172/JCI119670) .
69. Sharina I, Krumenacker J, Martin E and Murad F. Genomic organization of $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of the mammalian soluble guanylyl cyclase genes. *Proc Natl Acad Sci US*. 2000; 97(20): 10878–10883 DOI: [10.1073 / pnas.190331697](https://doi.org/10.1073/pnas.190331697) .
70. Jiang Y and Stojilkovic S. Molecular cloning and characterization of soluble of $\alpha 1$ -soluble guanylyl cyclase gene promoter in rat pituitary cells. *J Mol Endocrinol*. 2006; 37(3): 503–515. DOI: [10.1677 / jme.1.02180](https://doi.org/10.1677/jme.1.02180) .
71. Pyriochou A and Papapetropoulos A. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. *Cell Signal* 2005; 17(4): 407–413. DOI: [10.1016/ j.cellsig.2004.09.008](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.09.008) .
72. Uray FP, Gonzalez de Alfonso RG, Lippo de Bécemberg I and Alfonso MJ. Muscarinic agonists acting through M2 acetylcholine receptors stimulate the migration of an NO-sensitive guanylyl cyclase to the plasma membrane of bovine tracheal smooth muscle. *J Recept Signal Transduct Res*. 2010; 30 (1): 10-23. DOI: [10.3109 / 10799890903325585](https://doi.org/10.3109/10799890903325585) .
73. Guerra de González L, Misle A, Pacheco G, Napoleon de Herrera V, González de Alfonso R, Lippo de Becemberg I and Alfonso MJ. Effects of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) and N omega(6)-nitro-L-arginine methyl ester (NAME) on cyclic GMP levels during muscarinic activation of tracheal smooth muscle. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58(4): 563-574. DOI: [10.1016 / S0006-2952 \(99\) 00115-x](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00115-X) .
74. Guerra de González L, Lippo de Bécemberg I, González de Alfonso R y Alfonso Rosas M. La Activación Muscarínica del Músculo Liso de las Vías Aéreas. *Arch. Vznos. Farmacol. y Terapéutica*. 1995; 14(1): 18-24.

75. Higashijima T, Uzu S, Nakajima T and Ross EM. Mastoparan a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (Gproteins). *J Biol Chem*. 1988; 263(14): 6491-6494.
76. Nakahata N, Abe MT, Matsuoka I and Nakanishi H. Mastoparan inhibits phosphoinositide hydrolysis via pertussis toxin-insensitive G-protein in human astrocytoma cells. *FEBS Lett*. 1990; 260(1): 91-94. DOI: [10.1016 / 0014-5793 \(90\) 80074-s](#) .
77. Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M and Kitada C. A new mast cell degranulating peptide "mastoparan" in the venom of *Vespula lewisii*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1979; 27(8): 1942-1944. DOI: [10.1248/ cpb.27.1942](#) .
78. Yajima Y, Uchino K, Ito H and Kawashima S. Mastoparan-stimulated prolactin secretion in rat pituitary GH3 cells involves activation of Gq/11 proteins. *Endocrinology*. 1997; 138: 1949-1958. DOI: [10.1210 / endo.138.5.111](#) .
79. Hori Y, Demura M, Iwadate M, Ulrich AS, Niidome T, Aoyagi H and Asakura T. Interaction of Mastoparan with Membranes Studied by ¹H-NMR Spectroscopy in Detergent Micelles and by Solid-State ²H-NMR and ¹⁵N-NMR Spectroscopy in Oriented Lipid Bilayers. *Eur J Biochem*. 2001; 268(2): 302-308. DOI: [10.1046 / j.1432-1033.2001.01880.x](#) .
80. Weingarten R, Ransnas L, Mueller H, Sklar LA and Bokoch GM. Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the alpha subunit of Gi. *J Biol Chem*. 1990; 265(19): 11044-11049.
81. Katsu T, Sanchika K, Yamanaka H, Shinoda S and Fujita Y. Mechanism of cellular membrane damage induced by melittin and mastoparan. *Jpn J Med Sci Biol*. 1990; 43(6): 259-260.

82. Hassan-Soto W, Guerra de González L, González de Alfonso R, Lippo de Bécemberg I and Alfonso MJ. Selective Mastoparan inhibition of muscarinic activation of bovine tracheal smooth muscle. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*. 2012; 31(4): 72-79.
83. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randal RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951; 265-275.
84. Bensadoun A and Weinstein D. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*. 1976; 70(1): 241-250. DOI: [10.1016/s0003-2697\(76\)80064-4](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(76)80064-4) .
85. Lippo de Bécemberg I, Peña de Aguilar E, Camarillo I, González de Alfonso R and Alfonso MJ. Muscarinic agents modify kinetics properties of membrane-bound guanylyl cyclase activity. *FEBS Lett*. 1989; 253(1-2): 16-22. DOI: [10.1016/0014-5793\(89\)80920-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)80920-2) .
86. Lippo de Bécemberg I, Correa de Adjounian MF, Sánchez de Villarroel S, Peña de Aguilar E, González de Alfonso R and Alfonso MJ. G-protein-sensitive guanylyl cyclase associated with plasma membranes. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 324(2): 209-215. DOI: [10.1006/abbi.1995.0032](https://doi.org/10.1006/abbi.1995.0032) .
87. Alfonso MJ, de Aguilar EP, de Murillo AG, de Villarroel SS, González de Alfonso R, Borges A and Lippo de Becemberg I. Characterization of a G Protein-Coupled Guanylyl Cyclase-B Receptor from Bovine Tracheal Smooth Muscle. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2006; 26(4): 269–297. DOI: [10.1080/10799890600766446](https://doi.org/10.1080/10799890600766446) .
88. Ehlert FJ. The interaction of 4-DAMP mustard with subtypes of the muscarinic receptor. 1996; 58(22): 1971-1978. DOI: [10.1016/0024-3205\(96\)00187-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(96)00187-7) .

89. Mangmool S and Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins (Basel)*. 2011; 3(7): 884-899. DOI: [10.3390/toxins3070884](https://doi.org/10.3390/toxins3070884) .
90. Cabrera-Vera TM, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR and Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 2003; 24(6): 765–781. DOI: [10.1210/er.2000-0026](https://doi.org/10.1210/er.2000-0026) .
91. Lee HY, Kim SD, Shim JW, Kim HJ, Yun J, Baek SH, Kim K and Bae YS. A pertussis toxin sensitive G-protein-independent pathway is involved in serum amyloid A-induced formyl peptide receptor 2-mediated CCL2 production. *Exp. Mol. Med.* 2010; 42(4): 302–309. DOI: [10.3858/emm.2010.42.4.029](https://doi.org/10.3858/emm.2010.42.4.029) .
92. Balashova N, Chang FJ, Lamothe M, Sun Q and Beuve A. Characterization of a Novel Type of Endogenous Activator of Soluble Guanylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(3): 2186-2196. DOI: [10.1074/jbc.M411545200](https://doi.org/10.1074/jbc.M411545200) .
93. Linder AE, McCluskey LP, Cole KR, Lanning KM and Webb RC. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 314(1): 9-15.
94. Hochheiser J, Haase T, Busker M, Sömmmer A, Kreienkamp HJ and Behrends S. Heterodimerization with the $\beta 1$ subunit directs the $\alpha 2$ subunit of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase to calcium-insensitive cell-cell contacts in HEK293 cells: Interaction with Lin7. *Biochem Pharmacol.* 2016; 15: 122-132. DOI: [10.1016/j.bcp.2016.10.008](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.008) .
95. Lad PM, Glovsky M, Richards J, Smiley PA and Backstrom B. Regulation of human neutrophil guanylate cyclase by metal ions, free radicals and the muscarinic cholinergic receptor. *Mol Immunol.* 1985; 22(7): 731–739. DOI: [10.1016/0161-5890\(85\)90138-5](https://doi.org/10.1016/0161-5890(85)90138-5) .

96. Guerra de González L. El Efecto de Agentes Muscarínicos sobre el Músculo Liso de las Vías Aéreas. la Regulación por segundos mensajeros tales como AMPc, GMPc, IP3 y el papel del ATP.; Trabajo de Ascenso a Profesora Asociado, Facultad de Medicina Universidad Central de Venezuela 1995.
97. Alfonzo MJ, Placeres-Uray F, Hassan-Soto W, Borges A, González de Alfonzo R and Lippo de Becemberg I. Two Guanylylcyclases Regulate the Muscarinic Activation of Airway Smooth Muscle. In: Current basic and pathological approaches to the function of muscle cells and tissues – from molecules to human. 2012; 6: 113-132. DOI: [10.5772/48684](https://doi.org/10.5772/48684) .
98. Nanoff C, Koppensteiner R, Yang Q, Fuerst E, Ahorn H and Freissmuth M. The carboxyl terminus of the G α -subunit is the latch for triggered activation of heterotrimeric G proteins. Mol Pharmacol. 2006; 69(1): 397-405. DOI: [10.1124/mol.105.016725](https://doi.org/10.1124/mol.105.016725) .
99. Dingus J and Hildebrandt JD. Synthesis and assembly of G protein $\beta\gamma$ dimers: comparison of in vitro and in vivo studies. Subcell Biochem. 2012; 63: 155-180. DOI: [10.1007/978-94-007-4765-49](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4765-49) .
100. Roskopf D, Koch K, Habich C, Geerdes J, Ludwig A, Wilhelms S, Jakobs KH and Siffert W. Interaction of G β 3s, a splice variant of the G-protein G β 3, with G γ . Cell Signal. 2003; 15(5): 479–488. DOI: [10.1016/s0898-6568\(02\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00140-7) .
101. Zhang FL and Casey PJ. Protein prenylation. molecular mechanisms and functional consequences. Annu Rev Biochem. 1996; 65: 241–269. DOI: [10.1146/annurev.bi.65.070196.001325](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001325) .
102. Lai RK, Perez-Sala D, Canada FJ and Rando RR. The gamma subunit of transducin is farnesylated. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87: 7673–7677. DOI: [10.1073/pnas.87.19.7673](https://doi.org/10.1073/pnas.87.19.7673) .

103. Yamane HK, Farnsworth CC, Xie HY, Howald W, Fung BK, Clarke S, Gelb MH and Glomset JA. Brain G protein gamma subunits contain an all- trans - geranylgeranylethanolamine methyl ester at their carboxyl termini. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(15): 5868–5872. DOI: [10.1073/pnas.87.15.5868](https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5868) .
104. Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Gutowski S, Sternweis PC. G protein gamma subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(15): 5873–5877. DOI: [10.1073/pnas.87.15.5873](https://doi.org/10.1073/pnas.87.15.5873) .
105. Dror RO, Mildorf TJ, Hilger D, Manglik A, Borhani DW, Arlow DH, Philippsen A, Villanueva N, Yang Z, and Lerch MT. Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*. 2015; 348(6241): 1361–1365. DOI: [10.1126/science.aaa5264](https://doi.org/10.1126/science.aaa5264) .
106. Louet M, Martinez J and Floquet N. GDP release preferentially occurs on the phosphate side in heterotrimeric G-proteins. *PLoS Comput Biol* 2012; 8(7): e1002595. DOI: [10.1371/journal.pcbi.1002595](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002595) .
107. Schroter G, Mann D, Kotting C and Gerwert, K. Integration of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, Steady-state Kinetics and Molecular Dynamics Simulations of Gi1 Distinguishes between the GTP Hydrolysis and GDP Release Mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(28): 17085–17095. DOI: [10.1074/jbc.M115.651190](https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651190) .
108. Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, Paris H and Bouvier, M. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor–G protein complexes. *Nature structural & molecular biology*. 2006; 13: 778–786. DOI: [10.1038/nsmb1134](https://doi.org/10.1038/nsmb1134) .
109. Preininger AM, Kaya AI, Gilbert JA and Busenlehner LS, Armstrong RN, and Hamm HE. Myristoylation exerts direct and allosteric effects on G-conformation and dynamics in solution. *Biochemistry*. 2012; 51(9): 1911–1924. DOI: [10.1021/bi201472c](https://doi.org/10.1021/bi201472c) .

- 110.Liu Y, Kahn RA, and Prestegard JH. Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1. *Structure*. 2009; 17(1): 79–87. DOI: [10.1016/j.str.2008.10.020](https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.020) .
- 111.Liu Y, Kahn RA and Prestegard JH. Dynamic structure of membrane anchored Arf*GTP. *Nature structural & molecular biology*. 2010; 17(7): 876–881. DOI: [10.1038/nsmb.1853](https://doi.org/10.1038/nsmb.1853) .
- 112.Chen CA, and Manning DR. Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene*. 2001; 20(13): 1643–1652. DOI: [10.1038/sj.onc.1204185](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204185) .
- 113.Wright MH, Heal WP, Mann DJ and Tate EW. Protein myristoylation in health and disease. *Journal of chemical biology*. 2010; 3(1): 19–35. DOI: [10.1007/s12154-009-0032-8](https://doi.org/10.1007/s12154-009-0032-8) .