

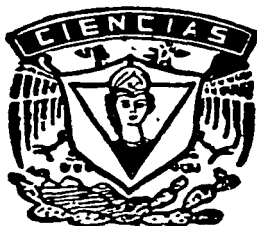


146
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA
DEL RECEPTOR α_{1a} ADRENERGICO
CLONADO DE HIGADO DE CUYO".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
DULCE MARIA MORA RODRÍGUEZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. JESÚS ADOLFO GARCIA SAINZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización Farmacológica del receptor α_1 adrenérgico
clonado de hígado de cuyo".

realizado por Dulce María Mora Rodríguez.

con número de cuenta 9455558-1 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Propietario

Dra. Rocío Alcántara Hernández

Propietario

Biol. Julio Prieto Sagredo

Suplente

Dra. Alicia Enriqueta Brechu Franco

Suplente

Dr. Silvestre De Jesús Alvarez Espidio

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICAS

Agradezco sinceramente al Dr. García Sáinz por la dirección y supervisión de mi trabajo de tesis y por lo enriquecedora que fue mi experiencia dentro de su laboratorio, tanto en el aspecto científico como en el humano.

También la colaboración y el apoyo de mis compañeros de laboratorio Rocío, Eréndira, Paty, Claudia, Agustín, Paco, José, Andrés, Yoshiaki, Fabián, Lupita Jiménez y muy especialmente a Tere Romero quién dedicó tiempo y atención para enseñarme a trabajar en el laboratorio.

Dedico esta tesis a mi hija María Fernanda, cuya tierna compañía ha sido mi gran inspiración.

A mi esposo Eduardo quien me acompañó en todo momento y me apoyó incondicionalmente.

A mi abuelita Conchita, a la que quiero, respeto y admiro profundamente.

A mis padres Dulce y Armando.

A mis hermanos Armando y Héctor.

A mi tía Ara.

A Mireya y Edwin.

A mis tíos Tere, Mario, Rosita, Francisco, Carlos, Viky.

A Conchita, Rosy, Tere, Sandra, Magda y Mario C.

*A mi tía Conchis y a mi primo Luis Fernando. Los llevo en mi corazón.

ÍNDICE

	página
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
I. Comunicación celular.	7
II. Transducción de señal.	12
II.1. Receptores de siete dominios transmembranales asociados a proteínas G	14
II.2. Proteínas G	15
II.3. Algunas vías de transducción de proteínas G	18
III. Catecolaminas endógenas	24
III.1. Efectos de las catecolaminas	25
III.2. Biosíntesis de las catecolaminas	26
IV. Receptores adrenérgicos.	27
IV.1. Modelo estructural de los receptores adrenérgicos	27
IV.2. Desensibilización de receptores	29
IV.3. Tipos de receptores adrenérgicos.	31
V. Receptores α_1	31
V.1. Clasificación farmacológica. Agentes α_1 adrenérgicos	35
VI. Antecedentes	38
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y MÉTODOS	43
I. Materiales	43
II. Métodos	44
II.1. Transformación de bacterias y purificación de plásmido	44
II.2. Cultivo celular y transfección	46
II.3. Purificación de membranas	47
II.4. Estudios de asociación de ligandos radioactivos en membranas plasmáticas	48
II.5. Purificación de fosfatos de [3 H]inositol	49
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN	70
CONCLUSIONES	78
APÉNDICE: Propiedades de las interacciones ligando-receptor	79
BIBLIOGRAFIA	82

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Introducción		Página
Fig.I	Ciclo regulatorio de la proteína G heterotrimérica	17
Fig.II	Sistemas de transducción de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C	20
Fig.III	Ciclo metabólico del fosfatidil inositol 4.5-bisfosfato	23
Fig.IV	Estructura del catecol	24
Fig.V	Biosíntesis de la norepinefrina y de la epinefrina	26
Fig.VI	Sitios de interacción del receptor con epinefrina	28
Cuadro I	Glándulas y tejidos endocrinos en vertebrados	10
Cuadro II	Tipos de receptores α_1	34
Materiales y Métodos		
Fig.VII	Esquema general de experimentos	51
Resultados		
Fig.1	Curva de saturación y Scatchard con [3 H] prazosina.	58
Fig.2	Curva de saturación y Scatchard con [3 H] tamsulosina.	59
Fig.3	Curvas ante la preincubación con CEC y [3 H] prazosina.	60
Fig.4	Curvas ante la preincubación con CEC y [3 H] tamsulosina	61
Fig.5	Desplazamientos con agonistas y [3 H] tamsulosina.	62
Fig.6	Desplazamientos con antagonistas y [3 H] tamsulosina.	63
Fig.7	Curva de correlación: receptor nativo & receptor clonado.	64
Fig.8	Efecto de la epinefrina en la producción de IP_2 , IP_2 e IP_1 .	67
Fig.9	Efecto de la epinefrina en la producción fosfatos de inositol totales.	68
Fig.10	Perfil de elución de los fosfatos de inositol.	69
Cuadro 1	Parámetros de pruebas de asociación de ligandos y efecto de preincubación con CEC.	55
Cuadro 2	Parámetros de estudios de competencia con [3 H] tamsulosina.	57
Apéndice		
Fig. A	Curva de saturación típica de una interacción ligando receptor y curva de Scatchard.	80

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina bifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AMPe	Adenosina monofosfato cíclico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ADN	Acido desoxirribonucleico
AC	Adenilil ciclasa
B_{max}	Pegado máximo
Ca^{2+}	Ión calcio.
CEC	Cloroetilclonidina
Cys	Cisteina
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Proteína G	Proteína que hidroliza GTP
GC	Guanilato ciclasa
GDP	Guanosina bifosfato
GPCRs	Receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GRKs	Cinastas de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas.
GTP	Guanosina trifosfato
IP_1	Inositol monofosfato
IP_2	Inositol 1.5-bifosfato
IP_3	Inositol 1.4.5-trifosfato
IP_4	Inositol 1.3.4.5-tetrafosfato
K^+	Ión potasio
K_d	Constante de disociación
K_i	Constante de asociación
LB	Luria Bertani
PBS	Solución salina con amortiguador de fosfatos

Pi	Fòsforo libre
PI	Fosfatidilinositol
PIP ₁	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteina cinasa A
PKC	Proteina cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC β	Fosfolipasa beta
PLC γ	Fosfolipasa gamma
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

RESUMEN

Tanto la epinefrina como la norepinefrina son dos importantes mensajeros celulares que inician su acción al interactuar con los receptores adrenérgicos, un grupo heterogéneo de proteínas pertenecientes a la familia de receptores de siete dominios transmembranales asociados a proteínas G heterotriméricas.

Al estudiar a los tipos de receptores expresados en tejidos de distintas especies de animales, se ha observado que el tipo β adrenérgico presenta un patrón de expresión tejido-específico, a diferencia de los receptores pertenecientes al α_1 adrenérgico.

En trabajos previos a esta tesis se determinó que el receptor expresado en membranas de hepatocitos de cuyo corresponde farmacológicamente al subtipo α_{1A} (García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz y Romero-Avila, 1993; García-Sáinz et al., 1995). Recientemente nuestro laboratorio realizó la clonación del receptor (Gonzalez-Espinosa, C. et al., 2001). En esta tesis se presenta la caracterización farmacológica del receptor α_{1A} -adrenérgico clonado de células de hígado de cuyo y expresado en células Cos-1. La caracterización se realizó mediante pruebas de asociación de un ligando radioactivo. Por estudios de saturación se determinó que el receptor clonado presenta una alta afinidad por los ligandos [3 H]tamsulosina y [3 H]prazosina. Al preincubar las membranas de las células COS-1 con cloroetilclonidina, se observó una pequeña disminución en el valor del pegado máximo con ambos radioligandos. Utilizando al agente [3 H]tamsulosina se realizaron pruebas de competencia de asociación con distintos agentes. Los agonistas presentaron el siguiente orden de potencia: oximetazolina > epinefrina > norepinefrina >

metoxamina; y los antagonistas el siguiente: prazosina \geq 5 metil urapidil = benoxatián > fentolamina >> BMY 7378. Para determinar la funcionalidad del receptor se midió el incremento de fosfatos de [³H]inositol ante el estímulo (epinefrina) el cual fue bloqueado casi totalmente con el antagonista prazosina. Tanto los parámetros farmacológicos como los funcionales indican que el receptor clonado de hepatocitos de cuyo corresponde al subtipo α_{1a} - adrenérgico.

INTRODUCCIÓN

I. COMUNICACIÓN CELULAR

Un organismo multicelular requiere de mecanismos que permitan a sus células comunicarse unas con otras para poder coordinar de manera óptima procesos como el crecimiento, la división celular, el desarrollo y la diferenciación (Shinitzky, 1995). Las células de los animales superiores se comunican por medio de moléculas mensajeras que incluyen proteínas, pequeños péptidos, aminoácidos, nucleótidos, esteroides, retinoides, derivados de ácidos grasos e incluso gases disueltos. En general, según Shinitzky (1995) las células se pueden comunicar de tres formas:

- 1) **Por pequeñas moléculas.**- Estas pasan a través de uniones "gap" formadas en la membrana plasmática y que conectan el citoplasma de dos células contiguas. A través de estas uniones se da el intercambio de moléculas intracelulares pequeñas como el calcio y el adenosín monofosfato cíclico (AMPC), pero no de macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos.
- 2) **Por moléculas localizadas en la superficie celular.** La comunicación se da entre células adyacentes donde moléculas de la superficie de una célula hacen contacto con receptores en la membrana de la célula contigua, como es la comunicación yuxtacrina.
- 3) **Por moléculas secretadas.** Estas pueden actuar sobre células blanco que están a cierta distancia. La comunicación celular via moléculas secretadas se puede clasificar en tres categorías, basándose en la distancia sobre la que la señal actúa: comunicación endocrina y neuroendocrina; paracrina y autocrina; sináptica o neurotransmisión.

a) Comunicación endocrina y neuroendocrina:

La comunicación endocrina ocurre a una distancia relativamente grande entre las células que secretan al mensajero (hormona) y las células blanco. Las células secretoras usualmente se organizan en glándulas que vierten las hormonas al torrente sanguíneo por el cual son transportadas hasta encontrarse con sus células blanco. En la comunicación neuroendocrina la célula formada a partir del tejido nervioso secreta una neurohormona que viaja en el torrente sanguíneo para interactuar con células receptoras.

b) Comunicación paracrina y autocrina:

Cuando las moléculas son secretadas por una célula y actúan como mediadores locales afectando sólo a las células en el ambiente inmediato de la célula que lo produce, se dice que es un proceso de señalización paracrina. Las células con comunicación autocrina secretan moléculas que pueden asociarse a sus propios receptores.

c) Comunicación sináptica o neurotransmisión:

Es la comunicación química mediada por neurotransmisores que se observa en el sistema nervioso y aunque es una modalidad de comunicación paracrina se le separa en otra categoría porque la distancia entre la célula que produce el neurotransmisor (presináptica) y la célula receptora (postsináptica) es extremadamente corta y especializada, i.e. el espacio sináptico.

En el cuadro I se indican algunas hormonas, su origen y sus funciones principales en diferentes tejidos, órganos y en algunas especies. La epinefrina, por ejemplo se considera una hormona y la norepinefrina un neurotransmisor, ambos son secretados en la médula de

la glándula suprarrenal y ambos tienen efectos fisiológicos sobre células nerviosas, músculo, etc.

Estos sistemas de comunicación tienen en común que la molécula señal tiene que interactuar específicamente con una proteína particular de la célula blanco llamada receptor.

Los receptores son macromoléculas específicas u oligómeros que reconocen y se asocian a ligandos específicos. Los receptores se expresan en las células tanto solubles como transmembranales y presentan características particulares, tales como una afinidad determinada, número saturable de sitios, reversibilidad y estereoespecificidad por sus ligandos (Howard, 1993).

En la comunicación endocrina y paracrina las moléculas se asocian con relativamente alta afinidad (aproximadamente 0.1 nM) y responden a concentraciones bajas del ligando en el rango pM – nM, en una escala de tiempo que va de minutos en algunos casos; mientras que los ligandos para los receptores de neurotransmisores se asocian con relativa baja afinidad entre 1 – 100 nM por lo que se activan a concentraciones relativamente altas del ligando (μ M), pero con una rápida respuesta del receptor (ms – s) (Shinitzky, 1995).

Cuadro 1. Principales glándulas y tejidos endocrinos de los vertebrados.

GLANDULA	HORMONA	FUNCIONES PRINCIPALES
Pituitaria (adenohipófisis y neurohipófisis)	Adrenocorticotrópica Tirotrópica Foliculoestimulante Luteinizante Prolactina Estimulante de los melanocitos Hormona del crecimiento Antidiurética o vasopresina Oxitocina	Estimulante de la corteza adrenal Estimula la tiroides Desarrollo folicular en ovario y de los túbulos seminíferos en testículo En hembras ovulación y conversión del folículo en cuerpo luteo: producción de progesterona. En machos síntesis y secreción de andrógenos. Producción de leche y osmorregulación en peces. Dispersión de melanina en células pigmentarias de la piel en anfibios. Estimula el crecimiento y la producción de factores de crecimiento Reabsorción de agua en el riñón: contracción del músculo liso vascular. Contracción del músculo uterino y eyeción de leche.
Corazón	Factor natriurético atrial	Aumenta la excreción renal de sodio y agua
Suprarrenal: Corteza Médula	Glucocorticoides Mineralocorticoides Andrógenos y progesterona Epinefrina y norepinefrina	Metabolismo de los carbohidratos y reacciones de estrés. Metabolismo y excreción de sodio. Estimulación de los caracteres sexuales secundarios masculinos. Efectos múltiples sobre nervios, músculos, secreciones celulares y metabolismo.
Hipotálamo	Neurohormonas que actúan sobre la adenohipófisis	Regulan la secreción de hormonas en la adenohipófisis.
Hígado	Factores de crecimiento parecidos a la insulina	Estimulan el crecimiento.
Ovario	Estrógenos Progesterona Relaxina	Inician y mantienen los caracteres sexuales secundarios femeninos, actúan sobre el endometrio. Desarrollo femenino: secreción del endometrio; inhibe la liberación de la hormona luteinizante. Relajación de los ligamentos pélvicos y del cervix uterino durante el parto.
Páncreas	Insulina Glucagon Somatostatantina Polipéptido pancreático	Metabolismo de glucosa y almacenamiento de nutrientes. Aumenta la glucosa sanguínea: gluconeogénesis y glicogenólisis. Inhibe la secreción de insulina y glucagon. Estimula la secreción gástrica de HCl
Paratiroides	Hormona paratiroidea	Aumenta la concentración de Ca^{2+} en la sangre y disminuye la concentración de PO_4^{3-}

Pineal	Melatonina	Acción antionadotrópica: regulación de algunos ritmos biológicos.
Placenta	Gonadotropina coriónica	Síntesis de progesterona por el cuerpo luteo
Plasma angiotensinógeno	Angiotensina II	Vasoconstricción y secreción de aldosterona: conducta dipsogénica.
Riñón	Renina Dihidroxicolecalciferol Eritropoyetina	Aumenta la presión arterial y estimula la corteza suprarrenal. Aumenta la absorción intestinal de calcio: calcificación de huesos. Eritropoyesis.
Testículo	Testosterona	Inicia y mantiene los caracteres sexuales secundarios masculinos.
Timo	Hormona tímica	Proliferación y diferenciación de linfocitos.
Tiroides	Tiroxina y triyodotironina Calcitonina	Metabolismo oxidativo (calorigénesis): metamorfosis en anfibios: inhiben la liberación de hormona tirotrópica. Regula el nivel de calcio en sangre.
Tracto gastrointestinal	Colecistoquinina Quimodena Gastrina Neurotensina Secretina Substancia P Péptido vasoactivo intestinal	Secreción de enzimas pancreáticas y de bilis vesicular. Secreción de quimotripsinógeno del páncreas exócrino. Secreción de ácido gástrico (HCl). Neurotransmisor entérico Secreción de bicarbonato por células acinares pancreáticas. Neurotransmisor entérico. Secreción intestinal de electrolitos.
Casi todos los tejidos	Leucotrienos, prostaciclina, prostaglandinas, tromboxanos	Regulan la formación de nucleótidos cíclicos
Algunos tejidos	Endorfinas Factor de crecimiento epidérmico Factor de crecimiento de fibroblastos Factor de crecimiento de los nervios Somatomedinas	Actividad similar a los opiáceos. Proliferación de células epidérmicas. Proliferación de fibroblastos. Desarrollo de neuritis Desarrollo y proliferación celular.

Tomado y adaptado de Fanjul et al., 1998 y de Eckert 1997.

II. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL EXTRACELULAR

Cuando la molécula señal, debido a su naturaleza hidrofílica no puede atravesar la membrana plasmática, el mensaje es transmitido al interior de la célula mediante un mecanismo llamado transducción de señales, permitiendo que el mensaje se transduzca a través de la membrana mediante la asociación y disociación de la molécula señal o ligando extracelular con proteínas de membrana, sus receptores específicos. De esta manera las células responden a los requerimientos del organismo.

La asociación del ligando llamado también primer mensajero con su receptor conduce a la activación de proteínas efectoras, es decir proteínas asociadas a él. La activación del receptor puede resultar en un aumento de la actividad catalítica intrínseca del propio receptor. Las proteínas efectoras incluyen ciclasas de nucleótidos: adenilil ciclasa y guanilato ciclasa (AC y GC), fosfolipasas A₂, C y D, canales iónicos como los de Ca²⁺ y K⁺, proteínas cinasas de residuos de tirosina y serina y/o treonina y otras enzimas o proteínas reguladoras. La mayoría de estos efectores son capaces de producir moléculas conocidas como segundos mensajeros, los cuales son moléculas no proteicas, tales como el adenosina monofosfato cíclico (AMPc) y el guanosina monofosfato cíclico (GMPc) fosfoinosítidos, diacilglicerol (DAG), Ca²⁺, etc., que regulan la actividad de diversas proteínas transductoras como por ejemplo las cinasas de serina/treonina, las cuales son capaces de regular la actividad de enzimas, canales y la transcripción de ciertos genes (Shinitzky, 1995).

Existen tres familias principales de receptores ubicados en la membrana plasmática, con base en su estructura:

Receptores canal

Estos receptores están involucrados en el componente ionotrópico de la sinapsis química entre células con membrana excitable. El neurotransmisor al asociarse al receptor canal lo abre o lo cierra de manera transitoria, induciendo con ello cambios selectivos en la permeabilidad de la membrana. Por ejemplo los receptores nicotínicos de acetilcolina que al activarse cambian la permeabilidad por K^+ y Na^+ (Eckert, 1997).

Receptores con actividad enzimática o asociados a enzimas

Es un grupo heterogéneo de receptores, la mayoría con actividad de cinasa o asociados a proteínas cinasas, tienen su sitio de unión al ligando en la parte exterior de la membrana y su parte catalítica en la parte interior o citoplasma. Por ejemplo los receptores de la insulina o los receptores del factor de crecimiento epidérmico (Eckert, 1997).

Receptores de siete dominios transmembranales asociados a proteínas G

Los receptores que pertenecen a esta superfamilia son proteínas transmembranales, que se encargan de transmitir señales al interior de la célula mediante la interacción con proteínas G heterotriméricas. Estos responden a agentes como lípidos, aminoácidos (aa), derivados de aminoácidos, péptidos pequeños y a estímulos muy específicos como la luz, los sabores y los olores (Watson, S. et al., 1994). En la siguiente sección se ampliará la discusión sobre estos receptores por ser el tema central de esta tesis.

II.1 RECEPTORES DE SIETE DOMINIOS TRANSMEMBRANALES ASOCIADOS A PROTEINAS G.

Estos receptores intervienen en la regulación de la actividad de otra proteína de membrana, que puede ser una enzima o un canal iónico. Entre las proteínas pertenecientes a esta superfamilia están receptores a hormonas, neurotransmisores y a fotones. La interacción del receptor con la proteína efectora se da a través de proteínas intermedias, las proteínas G heterotriméricas; por ello a este grupo de receptores se les denomina GPCRs (del inglés G Protein Coupled Receptors). Estas se caracterizan por tener siete secuencias de aproximadamente 20 a 25 aa hidrofóbicos que representan las regiones transmembranales de la proteína con una disposición estructural de α -hélice (Findley et al., 1990). Tienen un extremo amino terminal extracelular que puede variar mucho en su longitud, desde menos de 10 residuos de aa hasta cientos de ellos, tienen tres asas intracelulares y tres asas extracelulares que contienen desde 10 aa hasta 40 aa y un extremo carboxilo terminal intracelular que junto con la tercera asa intracelular puede tener hasta 150 residuos de aa (Watson et al., 1994).

El sitio de unión del receptor para el ligando que lo activa, en la mayoría de los casos, incluye residuos de la región transmembranal. Estas son regiones altamente conservadas entre los miembros de cada familia de receptores, mientras que en las regiones extracelulares se observa menor homología de la secuencia de aa.

Aunque los GPCRs generalmente se reconocen como entidades monoméricas, existe evidencia que sugiere que pueden formar dímeros funcionales tal como lo

demonstraron Angers et al. (1999) para los receptores β_2 adrenérgicos de humano. los cuales pueden formar homodímeros constitutivos cuando éstos se expresan en células HEK -293.

II.2 PROTEÍNAS G

Las proteínas G heterotriméricas que interactúan con receptores de siete dominios transmembranales están formadas de tres polipéptidos: una subunidad α que se asocia e hidroliza al GTP, una subunidad β y una subunidad γ , todas ellas codificadas por distintos genes. La subunidad β y la γ forman un dímero estructural pero funcionan como monómero ya que sólo se disocian en condiciones de desnaturalización. Mientras el GDP está unido a la subunidad α ésta se asocia al dímero $\beta\gamma$ para formar un heterotrímero inactivo que adopta la conformación que se une con alta afinidad al receptor. Cuando una señal estimula al receptor, éste se activa y cambia su conformación, la consecuencia de este cambio en la proteína G es que la subunidad α disminuye su afinidad por el GDP, el que se separa de la subunidad γ es substituído por GTP (debido a la alta concentración de GTP en la célula) asumiendo la subunidad su conformación activa y ocasionando la disociación tanto de $\beta\gamma$ como del receptor. El estado activado de la subunidad α dura mientras el GTP es hidrolizado a GDP debido a la actividad intrínseca de GTPasa que tiene la subunidad α , entonces se forma de nuevo el heterotrímero inactivo que se reasocia con el receptor (fig. I).

Tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ son capaces de activar y/o regular distintos efectores, por ejemplo canales de potasio (K^+), fosfolipasa C β (PLC β), fosfolipasa A (PLA), fosfatidil-inositol 3 cinasa, etc.. Hace algunos años Wei-Jen Tang y Alfred Gilman (1991) demostraron que las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G presentan diversos efectos

regulatorios sobre ciertos subtipos de adenilil ciclasa (AC), todas activadas por la subunidad α de la proteína G_s , un tipo de AC se inhibe con $\beta\gamma$, otro tipo de AC de manera sinérgica se activa con $\beta\gamma$, y la actividad de otro tipo no cambia en presencia de $\beta\gamma$. Es decir, el efecto final depende del tipo específico de efector membranaral.

En mamíferos se conocen 20 distintas subunidades α que debido a la homología de sus secuencias se pueden dividir en 4 clases: α_s , α_i , α_q y α_{12} , que también definen a la familia de la proteína: G_s , G_i , G_q y G_{12} . Entre las funciones de las diferentes subunidades α están: α_s estimulación de la enzima adenilil ciclasa y regulación de canales de Ca^{2+} ; α_i inhibición de la enzima adenilil ciclasa, regulación de canales de K^+ y Ca^{2+} y activación de la cGMP fosfodiesterasa; α_q activación de la PLC; α_{12} regulación del intercambio de los iones Na^+/K^+ . Las células usualmente contienen cuatro o cinco tipos de subunidades α (Neer, 1995), en tanto que de la subunidad β en mamíferos se conocen 5 tipos y de la subunidad γ 6 tipos. Laugwitz et. al. (1996) demostraron que el receptor humano de tirotopina activa a miembros de las familias G_s , $G_{q/11}$, G_i y G_{12} , lo que nos indica una compleja modulación de los efectores.

En células intactas algunos grupos de receptores, proteínas G y efectores se organizan en microdominios y no tienen acceso a otros grupos, por ejemplo el grupo de Hansen (1994) demostró que γ_s se localiza en las adhesiones focales de fibroblastos cardíacos neonatales colocalizadas con vinculina (proteína asociada a fibras de estrés). En células transfectadas la organización de los elementos en los sistemas de transducción no es idéntica a la organización en las células no transfectadas, debido a que la sobre-expresión satura los compartimentos normales desplazando a los componentes de la señal a lugares anormales (Neer, 1995).

Entre las herramientas bioquímicas útiles para el estudio de estas proteínas en las vías de transducción están el empleo de toxinas bacterianas que actúan sobre sitios de activación o desactivación de la proteína G, tal es el caso de la toxina pertussis (aislada de la bacteria de la tosferina *Bordetella pertussis*) que ADP-ribosila a una cisteína localizada a 4 residuos del carboxilo terminal de algunas proteínas G_{α} , como la $G_{\alpha i}$ y la $G_{\alpha o}$. Esta modificación bloquea el efecto de acción inhibitorio sobre la adenilil ciclasa (Watson y Arkinstall 1994). Las proteínas $G_{\alpha q}$ no poseen el residuo de cisteína sustrato de la inhibición por la toxina pertussis, por lo que no son ADP-ribosiladas por esta toxina (Neer, 1995).

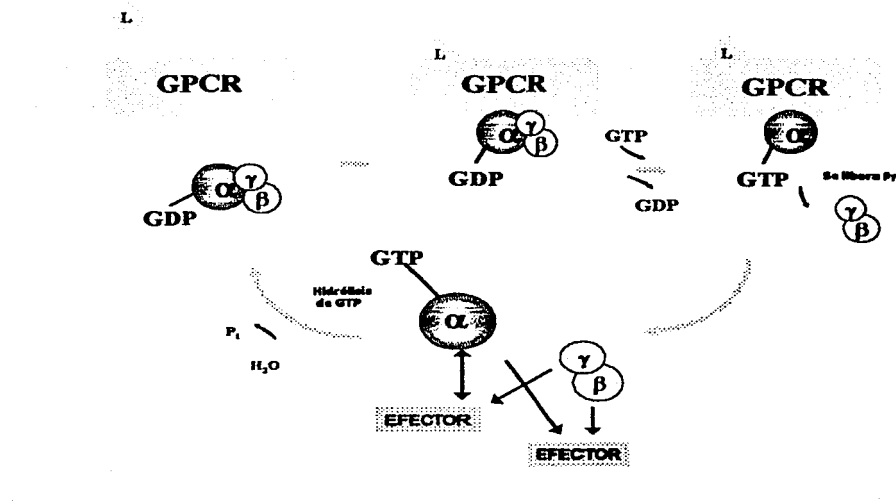


Fig. 1 Representación esquemática del ciclo regulatorio de la proteína G heterotrimérica

Los sistemas de efectores y de segundos mensajeros con los que se asocia la actividad de las proteínas G son diversos e incluyen canales de calcio y potasio, fosfolipasas, varios subtipos de adenilil ciclasas, entre otros, los que controlan procesos celulares muy importantes como el potencial de membrana, los niveles citosólicos de Ca^{2+} , la activación de cinasas, etc. Los receptores adrenérgicos, por ejemplo, al asociarse a 3 tipos de proteínas G (G_α , G_i y G_q) modulan dos sistemas de transducción, el de la adenilil ciclasa y el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio. (Zhong, 1999).

II.3 ALGUNAS VIAS DE TRANSDUCCIÓN DE PROTEÍNAS G

SISTEMA DE LA ADENILIL CICLASA

Tanto la proteína G_s como la G_i están involucradas en la modulación de una enzima de membrana, la adenilil ciclasa. Esta enzima en la mayoría de las células eucariontes está formada por dos regiones transmembranales con seis segmentos cada una y dos regiones citoplásmicas en las que se encuentran los dominios catalíticos (Hurley, 1999). Cuando el agonista se une al receptor por ejemplo la epinefrina al receptor β adrenérgico, éste activa a una proteína G que estimula (G_s) la actividad enzimática de la adenilil-ciclasa, influyendo positivamente en los niveles citosólicos del adenosín monofosfato cíclico (AMPc), si la epinefrina se une a receptores α_2 adrenérgicos entonces inhibe la actividad. El AMPc, un segundo mensajero formado por la enzima adenilil ciclasa a partir del adenosín trifosfato (ATP) activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc o proteína cinasa A (PKA) (fig II). La PKA fosforila residuos de serina, treonina o tirosina en una gran cantidad de sustratos específicos, cambiando el plegamiento de la cadena polipeptídica y por lo tanto su función.

Entre las proteínas reguladas por este mecanismo están receptores, canales iónicos y proteínas estructurales (Fanjul, 1998).

Ejemplos de respuesta celular mediada por el incremento en el nivel de AMP cíclico e inducido por epinefrina al activar a receptores β adrenérgicos son la movilización de lípidos en tejido adiposo: relajación en músculo liso: secreción de fluidos en intestino, etc. En cuanto a la disminución de niveles AMP cíclico en la célula inducido por la activación de los receptores α_2 adrenérgicos por epinefrina están la estimulación de agregados de plaquetas: disminución de la movilización de lípidos en adipositos, etc. (Eckert, 1997).

El glucagon es otra hormona que ocasiona respuesta celular mediada por los niveles de AMP cíclico, que al activar a la PKA produce la fosforilación de la fosforilasa b cinasa que a su vez se activa y fosforila a la glucógeno fosforilasa lo cual conduce a la liberación de glucosa al torrente sanguíneo (García-Sáinz, 1988). Como este efecto en la regulación de los niveles de glucosa, el AMPc estudiado por Sutherland en la década de los 60s, regula respuestas celulares muy importantes como la síntesis y secreción de la hormona tiroidea, secreción de progesterona en ovarios, de testosterona en las células intersticiales de testículo, reabsorción de agua en riñón, etc. (Fanjul, 1998 y Eckert, 1997).

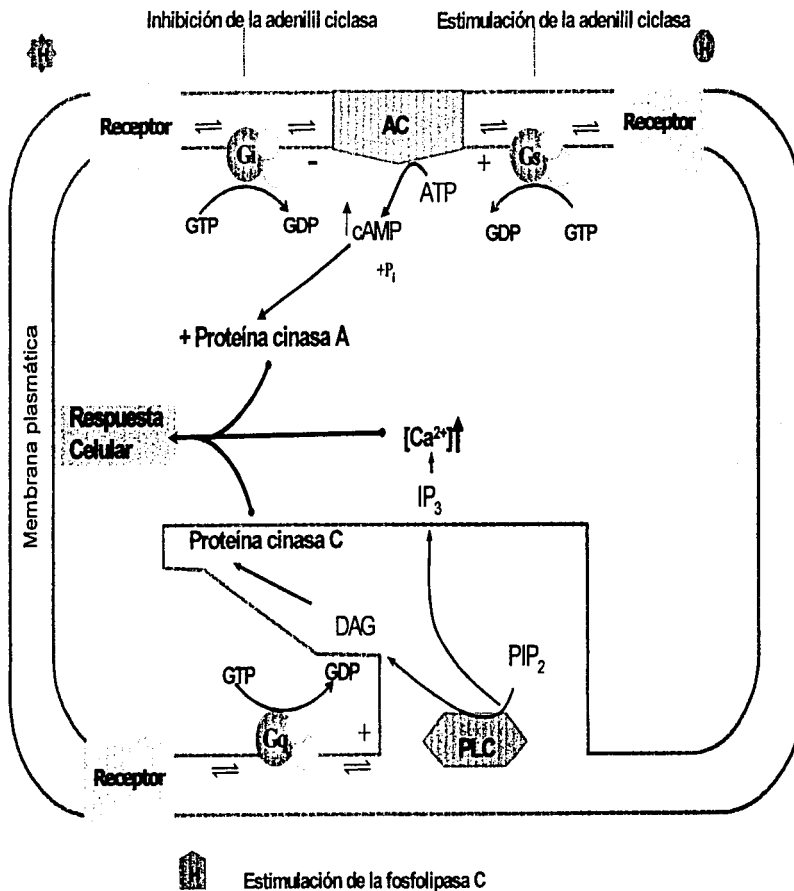


Fig. II. Representación esquemática de los sistemas de transducción de la adenilil ciclasa y de la fosfolipasa C. H=Hormona, DAG=Diacilglicerol, IP₃=Inositol 1,4,5-trifosfato, PIP₂=Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, PLC= Fosfolipasa C, AC= Adenilil ciclasa, GDP= Guanosina bifosfato, GTP= Guanosina trifosfato. Tomado de Goodman and Gilman (1990).

SISTEMA DE FOSFOINOSÍTIDOS-CALCIO

Las hormonas, los neurotransmisores y los factores de crecimiento son capaces de activar a las isoenzimas específicas de fosfoinosítidos, la fosfolipasa C, que hidroliza al fosfatidil inositol 4, 5-bifosfato produciendo dos segundos mensajeros intracelulares, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) (fig II).

Después de la producción del inositol trifosfato, una molécula soluble en agua, en células estimuladas se observa, además, la formación de inositol bifosfato y de inositol monofosfato. En la figura III se muestra gráficamente el ciclo metabólico del fosfoinositol.

El inositol 1,4,5-trifosfato actúa como segundo mensajero ya que se asocia a receptores situados en regiones modificadas del retículo endoplásmico llamadas calcisomas que almacenan Ca^{2+} (retículo sarcoplásmico en músculo) en esta región existen receptores tipo canal sensibles a IP_3 . Cuando interactúa con el receptor canal, éste se abre y permite que el ión salga de los almacenes por lo que se da un aumento en el nivel de Ca^{2+} intracelular. En células no-excitables, el influjo de Ca^{2+} se genera a través de la acción del IP_3 sobre proteínas canal en la membrana plasmática, sólo o en conjunción con mioinositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP_4), un metabolito del IP_3 (Exton, 1994).

Existen dos mecanismos básicos mediante los cuales los agonistas inducen la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5- bifosfato, en cada uno se activa un tipo específico de fosfolipasa C:

- a) Fosfolipasa C gamma ($PLC\gamma$). En este caso la activación de los receptores con actividad de tirosina cinasa para factores de crecimiento permite la autofosforilación en residuos específicos de tirosina en los dominios citosólicos del receptor en los que la $PLC\gamma$ se asocia y aumenta su actividad enzimática.

b) Fosfolipasa C beta (PLC β). En este caso la enzima se activa mediante proteínas G_{q/11} principalmente, las cuales están asociadas a receptores de siete dominios transmembranales que son activados por diversos tipos de hormonas y neurotransmisores.

Por su parte el DAG actúa también como un segundo mensajero regulando a la familia de proteínas cinasas que son llamadas proteínas cinasas C (PKC), ya que algunas de estas formas son activadas por Ca²⁺. El diacilglicerol se asocia al dominio regulatorio de la PKC ubicada en la membrana plasmática, ocasionando un cambio en su conformación que deja libre el sitio de asociación al sustrato del dominio catalítico, lo cual permite su activación (Smith, 1996). La PKC cataliza la fosforilación de múltiples proteínas celulares en residuos de treonina y/o serina, entre los que se encuentran algunos receptores cuyo efecto es la inhibición de la respuesta o desensibilización (Smith, 1996).

En este sistema de transducción la respuesta a la hormona (primer mensajero), se ve potenciada por la formación de los dos segundos mensajeros (IP₃ y DAG). Existe una relación directa entre la concentración de diacilglicerol y la activación de la PKC.

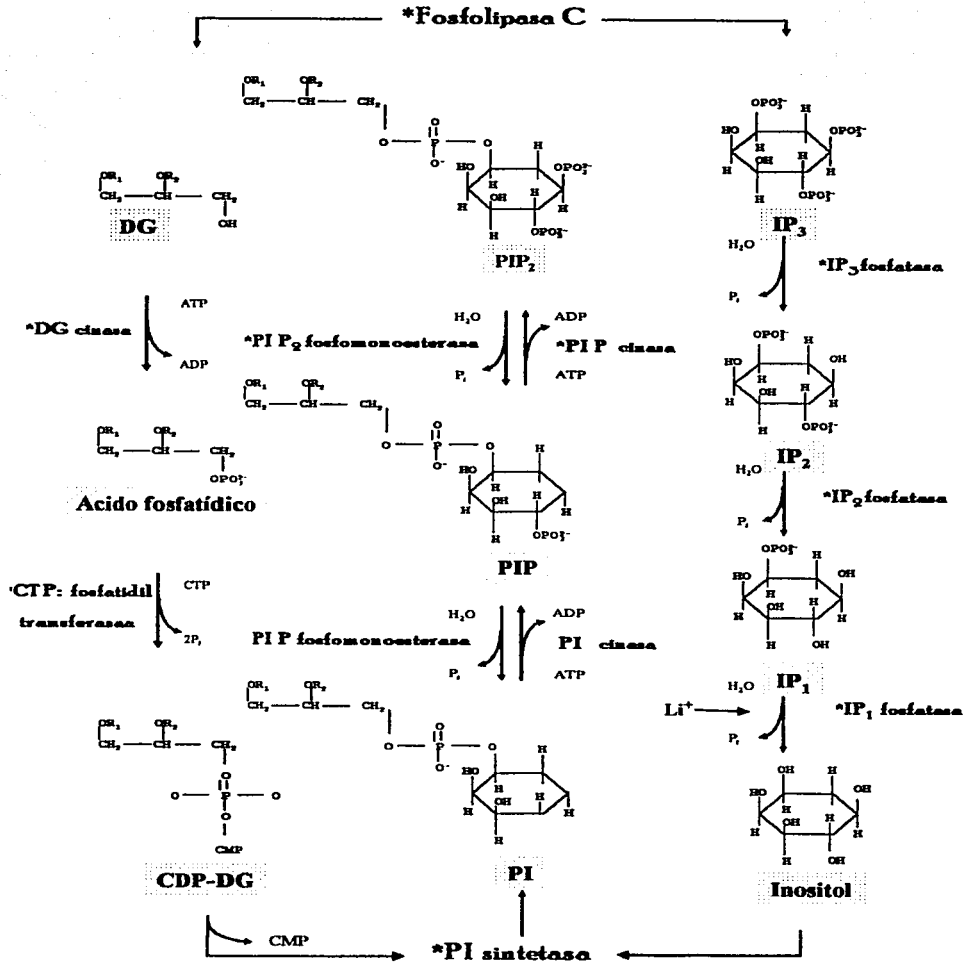


Fig. III. Ciclo metabólico del fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato. A la derecha, la vía de los fosfatos de inositol, a la izquierda la del diacilglicerol. Con asterisco * se marcan la enzimas involucradas. Tomado de Voet y Voet (1995).

III. CATECOLAMINAS ENDÓGENAS

El sistema nervioso autónomo regula un gran número de funciones viscerales sin el control de la conciencia: en este sistema se puede distinguir la regulación simpática y la regulación parasimpática que difieren tanto en su ubicación anatómica como en sus funciones y en la participación de neurotransmisores. La norepinefrina es el principal neurotransmisor en fibras postganglionares del sistema nervioso simpático periférico que inervan músculo liso, glándulas y el corazón, mientras que la epinefrina conocida también como adrenalina es una hormona sintetizada principalmente en células de la glándula suprarrenal (Eckert, 1997).

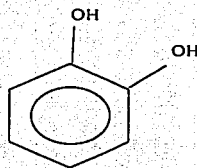


Fig. IV. Estructura del Catecol

Tanto la norepinefrina como la epinefrina y la dopamina se forman a partir del aminoácido tirosina y tienen grupos hidroxilo sustituidos en las posiciones 3 y 4 del anillo de benceno. Ya que el 1,2-dihidroxibenceno es conocido como catecol (fig. IV) a estos neurotransmisores y a la hormona epinefrina derivados del catecol se les conoce como catecolaminas (Goodman & Gilman's, 1996).

La adrenalina fue descubierta en 1895 por Oliver y Schäfer al observar que extractos de la glándula suprarrenal tenían efectos vasoconstrictores como el aumento en la tensión arterial y la frecuencia cardíaca. En 1899 Abel llamó al principio activo de estos extractos epinefrina, y posteriormente fue purificada por Stolz y Dakin. En 1910 Barger y

Dale identificaron su estructura química e hicieron estudios sobre la acción de estas aminas simpatomiméticas (Goodman & Gilman's. 1996).

III.1 EFECTOS DE LAS CATECOLAMINAS

Las catecolaminas se encuentran involucradas en la regulación de una gran cantidad de funciones en el organismo particularmente integrando respuestas para reaccionar ante el estrés. Según Hoffman y Lefkowitz (Goodman & Gilman's. 1996) entre los principales efectos de las catecolaminas y de los agentes afines a sus receptores, se pueden distinguir los siguientes:

- Acción excitatoria o inhibitoria sobre ciertos tipos de músculo liso.
- Acción excitatoria en el tejido cardíaco responsable del incremento en la frecuencia cardíaca y en la fuerza de contracción.
- Cambios en la presión sanguínea y redistribución de la sangre en el organismo, debido a su acción vascular.
- Efectos metabólicos como el aumento en el nivel de la glucogenólisis en hígado y en músculo, y la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo.
- Acciones endocrinas como la modulación en la secreción de insulina, glucagon, renina y hormonas pituitarias.
- Acciones del sistema nervioso central como la estimulación de la respiración y la regulación del apetito.
- Acciones presinápticas relacionadas con la distribución de neurotransmisores como la norepinefrina y la acetilcolina.

III.2 BIOSÍNTESIS DE LAS CATECOLAMINAS

La biosíntesis de las catecolaminas ocurre en el citosol de neuronas adrenérgicas y en células cromafines de la glándula suprarrenal. La norepinefrina es sintetizada a partir de la tirosina con dopa y dopamina como productos intermedios. La conversión de tirosina a dopamina ocurre en el citosol, catalizada por la tirosinohidroxilasa y la L-aromático aminoácido descarboxilasa. La dopamina es entonces incorporada en gránulos y convertida a norepinefrina. Esta reacción es catalizada por la dopamina β-hidroxilasa (DBH) que están contenidas en los gránulos secretorios. La norepinefrina es metilada a epinefrina, una reacción catalizada por una enzima que se encuentra en el citosol, la feniletanolamina N-metiltransferasa (Eckert, 1997).

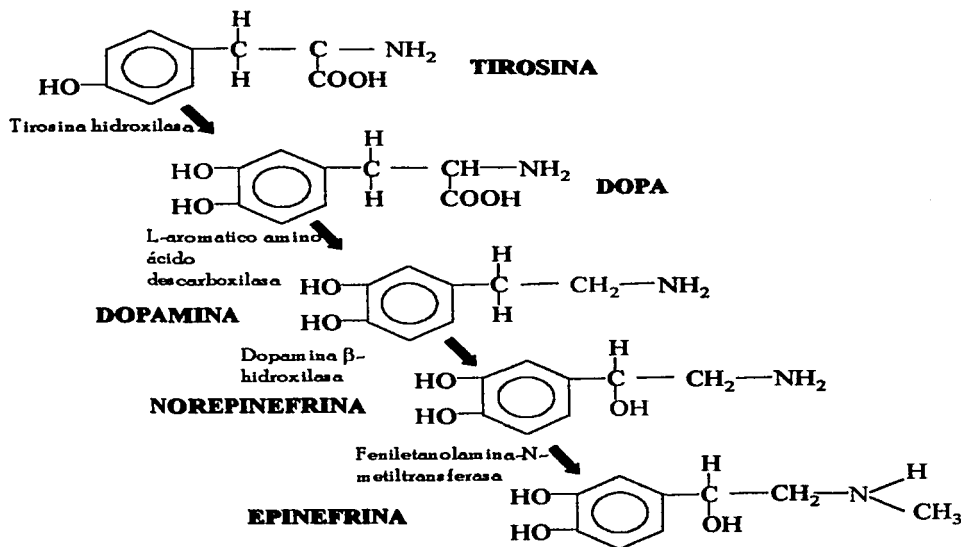


Fig. V. Biosíntesis de la norepinefrina y de la epinefrina. Tomado de Eckert, 1997

IV. RECEPTORES ADRENÉRGICOS

IV. 1 MODELO ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de los GPCRs, es decir receptores con siete dominios transmembranales, con un extremo amino terminal, tres asas intracelulares, tres extracelulares y un extremo carboxilo terminal. Existen algunos aminoácidos conservados en esta familia que juegan un papel muy importante para la unión del ligando. El modelo más aceptado indica que los dominios III, IV, V y VI forman una especie de bolsa o nido donde se da la unión con el ligando. En particular, el aspartato 113 del dominio transmembranal III tiene un papel muy importante en la unión del receptor con la catecolamina, ya que actúa como un contra-ión para la carga de la amina de la epinefrina (fig. VI). En el dominio transmembranal V se encuentran dos residuos de serina en las posiciones 204 y 207 que interactúan con los grupos hidroxilo para- y meta- del anillo de catecol, y el dominio IV transmembranal se produce una interacción hidrofóbica de la fenilalanina 290 con el anillo de catecol. Existen estudios que indican que en la segunda y la tercera asas intracelulares existen residuos de aminoácidos que están involucrados en la interacción con la proteína G específica para ese receptor. También se ha encontrado que el carboxilo terminal y las asas intracelulares influyen en la especificidad de la asociación con los ligandos (Revisado en García-Sáinz, 1995).

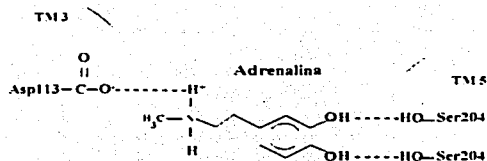


Fig. VI. Sitios de interacción del receptor con la epinefrina. Transmembranal III (TM3); transmembranal V (TM5); uniones no covalentes (-----).

En algunos casos por la técnica de electroforesis se observa un peso molecular mayor para el receptor al que se esperaría a partir de la secuencia de aminoácidos. En este sentido, se ha identificado que el extremo amino terminal tiene residuos de asparagina que están presentes en una secuencia consenso de glucosilación, lo que ocasiona un mayor peso molecular. Así como la glucosilación, la palmitoilación es una modificación postransduccional que puede ocurrir en los receptores adrenérgicos, así los receptores β_2 -adrenérgicos poseen un residuo de cisteína en su secuencia carboxilo-terminal al que se puede unir el palmitato, por medio de un enlace tioéster (Ovchinniko et al., 1988; O'Dowd et al., 1989), la unión del palmitato ocasiona que el receptor por medio de estos se ancle en la membrana plasmática y se forme una cuarta asa citoplásmica. A esta estructura característica de los GPCRs se relaciona aparentemente con la asociación a la proteína G correspondiente (Watson y Arkinstall, 1994).

IV.2 DESENSIBILIZACIÓN DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Los sistemas de transducción de señales son capaces de adaptarse ante un estímulo continuo, reduciendo su respuesta, mediante un fenómeno que se conoce como desensibilización del receptor. Existen muchas evidencias de que uno de los procesos involucrados inicialmente en este fenómeno es la fosforilación del receptor. Existen dos tipos de desensibilización, la homóloga y la heteróloga.

En el tipo homólogo, la reducción en la capacidad de respuesta se observa exclusivamente para el agente (agonista) que originalmente estimuló a la célula. En la desensibilización heteróloga la disminución en la capacidad de respuesta se observa para un agente o agentes no relacionados con el estímulo inicial. (Revisado en García-Sáinz et al., 2000).

En la desensibilización homóloga se acepta que la fosforilación del receptor esta mediada por proteínas cinasas específicas de receptores asociados a proteínas G que pertenecen a la familia de las GRKs (quinasas de receptores acoplados a proteínas G) que incluyen por lo menos 7 subtipos de proteínas cinasas de serina y/o treonina y que únicamente fosforilan al receptor en su estado activado por el agonista. En los receptores α_{1B} adrenérgicos se han localizado por estudios de mutagénesis dirigida estos sitios de fosforilación en residuos del carboxilo terminal como la Ser 404, la Ser 408 y la Ser 410 (Diviani et al., 1997).

En la desensibilización heteróloga se ha observado que la fosforilación del receptor es por cinasas estimuladas por segundos mensajeros, de tal manera que cualquier agente que incremente los niveles de AMPc o de diacilglicerol, tiene el potencial de inducir la fosforilación y en ocasiones la desensibilización de receptores asociados a proteínas G que

contengan los sitios consenso para ser sustratos de estas cinasas (Nambi et al., 1985; Diviani et al., 1997).

Entre las cinasas involucradas en la fosforilación de residuos de serina y/o treonina en los receptores α_1 adrenérgicos están la PKA y la PKC. ambas son activadas por segundos mensajeros. y también están algunos receptores con actividad de tirosina cinasa (García-Sáinz et al., 1999b y 2000). además de la familia de cinasas específicas de receptores asociados a proteínas G. las (GRKs) (Lin et al., 2000).

El modelo general de desensibilización describe que la fosforilación del receptor favorece su asociación con un tipo de proteína llamada arrestina (Krupnick et al., 1998). lo cual ocasiona el desacoplamiento del receptor y la proteína G lo que a su vez permite que otro tipo de proteínas. entre ellas la clatrina se asocie con éste y formen en conjunto una estructura susceptible de ser endocitada. Estudios realizados por Lin et al., (2000) han demostrado que además de las proteínas cinasas. las β -arrestinas y la clatrina. está involucrada de manera esencial una proteína llamada gravina que promueve la organización de complejos multiprotéicos. ya que esta es una proteína de anclaje. Otra proteína es la dinamina. proteína que tiene la capacidad de separar de la membrana plasmática a las vesículas formadas. a través de su actividad de GTPasa. para que posteriormente éstas sean secuestradas de manera dependiente de clatrina. En el interior de la célula el receptor puede ser degradado. o bien. al ser desfosforilado por fosfatasas. el receptor puede regresar a la superficie de membrana. de tal forma que el sistema se resensibiliza.

IV.3 TIPOS DE RECEPTORES ADRENÉRGICOS

En 1948 Arturo Rosenblueth y Canon observaron efectos opuestos de la epinefrina: es decir por un lado observaron contracción en músculo liso de aorta y por otro relajación en el músculo liso de los bronquios. También en 1948 Alhquist observó estos mismos efectos opuestos y propuso la existencia de dos tipos de receptores para el mismo agente. definió que la contracción esta mediada por el α y la relajación por el tipo β -adrenérgico. (Revisado en García-Sáinz. 1995).

Los receptores adrenérgicos se han distinguido principalmente con base en sus propiedades farmacológicas. ahora se conocen tres familias de receptores. la α_1 , la α_2 y la β . A su vez cada una consta de tres subtipos. dando lugar a nueve receptores adrenérgicos: α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} y β_1 , β_2 , β_3 . Cada familia de receptores adrenérgicos está asociada principalmente a un sistema de transducción específico. vía distintas proteínas G. Los receptores α_1 mediante la proteína G_q regulan la actividad de la fosfolipasa $C\beta$ estimulando el recambio de fosfoinosítidos y el incremento de Ca^{2+} ; los α_2 vía la proteína G_i inhiben la actividad de la enzima adenilil ciclasa disminuyendo la concentración citosólica del segundo mensajero AMPc y los receptores β adrenérgicos activan a la adenilil ciclasa vía la proteína G_s , aumentando la concentración del AMPc citosólico (Fain & García Sáinz. 1980)

V. RECEPTORES α_1

Los receptores α_1 -adrenérgicos regulan procesos fisiológicos tales como: el metabolismo de la glucosa en el hígado. la contracción del músculo liso (Piasik et al.. 1995 y 1997).

inotropía y cronotropía del miocardio (Graham et al., 1996), contracción del útero, regulación del agua y metabolismo de los electrolitos, modulación del tono vascular y la neurotransmisión sináptica (revisado por García-Sáinz et al., 1999).

Además de los efectos inmediatos en el organismo se conocen efectos a largo plazo, como el desarrollo celular y la proliferación, por lo que también los genes de los adrenorreceptores pueden ser considerados como protooncogenes (revisado por García-Sáinz et al., 1999). Se han realizado estudios para determinar su distribución observando la expresión de genes que los codifican (Pérez et al., 1994; Han et al., 1990; Ping y Faber, 1993; Piascik et al., 1994 y 1995; Eckhart et al., 1996; Guarino et al., 1996). Sin embargo el encontrar RNA mensajero no significa necesariamente que la proteína se exprese y que esta sea funcional. Por ello es necesario definir si hay expresión de la proteína y además realizar determinaciones funcionales del receptor (revisado por García-Sáinz et al., 1999).

De la estructura primaria de estos receptores se estima un peso molecular para estos receptores dentro de un rango de 37 a 45 kDa (Lomansney et al., 1991), aunque se ha observado que los receptores purificados tienen un peso molecular mayor al esperado (alrededor de 80, kDa) (Lomansney et al., 1986) probablemente por la gran glicosilación en el extremo amino terminal del receptor (Lefkowitz et al., 1988; Sawutz et al., 1987).

Como se mencionó, estos receptores de siete dominios transmembranales están asociados a las proteínas G principalmente insensibles a la toxina pertusis, pertenecientes a la familia $G_{q/11}$ (Wu et al., 1992). Además de movilizar el calcio intracelular debido al recambio de fosfoinosítidos, se ha demostrado que activan el influjo de calcio vía canales de calcio (Ljung y Kjellstedt, 1987). Estas respuestas fisiológicas están reguladas por los distintos subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos que existen (cuadro II). De acuerdo con la

Unión Internacional de Farmacología (Hieble et al. 1995) los receptores α_1 adrenérgicos se dividen en los subtipos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , basándose en la diferencia de afinidad a diferentes agonistas, antagonistas, agonistas inversos y agentes alquilantes (cuadro II).

La clonación molecular ha identificado tres tipos distintos de ADN complementario que codifican a los subtipos α_1 adrenérgicos: α_{1a} (identificado originalmente como α_{1c}), α_{1b} y α_{1d} (Cotecchia et al., 1988; Schwinn et al., 1990; Lomansney et al., 1991; Pérez et al., 1991). Los últimos estudios muestran evidencia de que la clona α_{1c} corresponde al adrenoceptor α_{1A} ; que la clona α_{1b} es la responsable de la expresión del α_{1B} así como la clona α_{1d} corresponde con la expresión del adrenoceptor α_{1D} (cuadro II) (Forray et al., 1994; Bylund et al., 1994).

Los tres subtipos de α_1 clonados son capaces de activar el recambio de fosfoinosítidos y el incremento de calcio (cuadro II). Se ha observado distinta efectividad de estos receptores para activar la vía, lo que sugiere diferencias entre la actividad intrínseca de cada subtipo. En general se ha observado que el subtipo α_{1A} es más efectivo en la activación de la vía metabólica que el α_{1B} , y que el α_{1D} es usualmente el menos efectivo de los tres (Revisado en García-Sáinz, 1999).

CARACTERISTICA	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Clona (nueva nomenclatura)	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Clona (nomenclatura histórica)	α_{1c}	α_{1b}	α_{1a} , α_{1d} , $\alpha_{1a/d}$
Localización en cromosomas de humano	C8	C5	C20
Peso molecular aparente	---	~80	~65
Número de aminoácidos	466	515	561
Sitios de glucosilación	3	4	2
Organización genómica			
• Intrones	1	1	1
• Exones	2	2	2
Proteína G acoplada	$G_{\alpha 11/13}$	$G_{\alpha 11/14/16}$	$G_{\alpha 11}$
Sistema de transducción	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfoinosítidos calcio. • Adelinato ciclasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfoinosítidos calcio. • Fosfolipasa A2. • Adelinato ciclasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfoinosítidos calcio. • Fosfolipasa A2
Efecto celular	IP3/Ca ²⁺ AMPcíclico	IP3/Ca ²⁺ AMPcíclico Liberación de ácido araquidónico	IP3/Ca ²⁺ AMPcíclico Liberación de ácido araquidónico
Sensibilidad a Cloroetilclonidina	± dependiente	Especie + + + +	+ + +
Agentes selectivos	SNAP - 5089 (+) Nigulipina 5-metil-urapidil Indoramina Oximetazolina Metoxamina A-61603 Tamsulosina	AH11110A	(+) Norepinefrina BMY 7378 SK & F105854
Agentes no selectivos	Prazosina Fentolamina	Prazosina Fentolamina	Prazosina Fentolamina

Cuadro II. Tipos de receptores α_1 -adrenérgicos

Tomado de: Hieble 1995; Romero-Avila, tesis de maestría 1998; Alcantara-Hernandez tesis de maestría 1997.

Evidencias recientes indican que los receptores α_1 no están exclusivamente localizados en la membrana celular. Hirasawa (1997) demostró que los α_{1B} se expresan sobre la superficie de la célula, mientras que los α_{1A} se expresan en compartimientos intracelulares. Igualmente McCune et al. (2000), han demostrado que los α_{1D} son expresados principalmente en compartimientos intracelulares. Los receptores α_{1D} adrenérgicos son constitutivamente activos ya que están sujetos a regulación por agonistas inversos, a éstos se les ha encontrado con una orientación perinuclear tanto en células de músculo liso vascular, como en fibroblastos. Sin embargo, estudios realizados por Hromets et al. (1999) en células rat-1 que expresan cada subtipo de α_1 , por separado muestran que los tres subtipos se expresan tanto en la superficie celular como en el interior de la célula. Mackenzie, et al (2000) realizó estudios en células de músculo liso de humano donde observó que el 40 % de los sitios de unión del ligando a los receptores α_{1A} adrenérgicos se da en compartimientos intracelulares.

V.1 CLASIFICACIÓN FARMACOLÓGICA. Agentes α_1 - adrenérgicos

Las diferencias en las propiedades farmacológicas a lo largo del estudio de los receptores adrenérgicos han sido determinantes para la clasificación de cada receptor estudiado.

Entre los agentes con alta afinidad para los receptores adrenérgicos están la fentolamina que es un antagonista α -adrenérgico y la prazosina que es un potente antagonista para los receptores α_1 . Otros agentes tienen selectividad por uno de los tres subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, por ejemplo el **WB4101** que se une con mayor afinidad al subtipo α_{1A} que al α_{1B} , este compuesto sirvió para que Morrow y Creess en 1986 identificaran a dos subtipos de adrenoceptores α_1 en corteza cerebral de rata en

función de la afinidad con la que se unían al ligando. Otro agente es el **5-metil-urapidil**, un potente antagonista del subtipo α_{1A} y con baja afinidad por los subtipos α_{1B} y α_{1D} (Gross 1988). Este compuesto muestra una afinidad 100 veces mayor por el α_{1A} que por los otros dos (García-Sáinz et al., 1993 a). La **tamsulosina** es un potente antagonista para los receptores del subtipo α_{1A} (García-Sáinz et al., 1995) y el **BMY 7378** es un agente selectivo para los receptores α_{1D} adrenérgicos (Goetz et al., 1995; Piasick et al., 1995).

Las propiedades farmacológicas del radioligando [3 H]tamsulosina fueron estudiadas en membranas celulares de diferentes tejidos de rata como el hipocampo, el bazo y la próstata, reportándose con una alta afinidad para los receptores α_1 , mostrando un pegado inespecífico muy bajo (Yazawa y Honda, 1993; Yazawa et al., 1992). En hepatocitos de conejo y rata, se observó que éste agente tiene mayor afinidad por los α_{1A} , que por los α_{1B} (García-Sáinz et al., 1995).

Así, agonistas como la **metoxamina** y la **oximetazolina** presentan una mayor afinidad por los α_{1A} que por los α_{1B} (García-Sáinz et al., 1985; Tsujimoto et al., 1989; Torres-Márquez et al., 1991; García-Sáinz et al., 1993a).

Por otro lado, la **epinefrina** y la **norepinefrina** son agonistas naturales de estos receptores (α y β) con alta afinidad, y tienen acciones diferentes principalmente debido a la proporción del número de receptores y su actividad intrínseca. Ambos agonistas tienen la misma efectividad para estimular receptores β_1 localizados en el corazón, aunque la epinefrina es un poco más potente que la norepinefrina en los receptores α de casi todos los órganos (Goodman & Gilman's, 1996).

Uno de los agentes más utilizados en estudios farmacológicos es el agente alquilante análogo de la clonidina, la **cloroetilclonidina**, que es capaz de inactivar a los

subtipos α_{1B} (Han et al., 1987; Minneman, 1988) y α_{1D} (Pérez et al., 1991; Hieble et al., 1995), a diferencia del subtipo α_{1A} que ha demostrado poca sensibilidad a este agente (LeClerc et al., 1980). Aunque existe controversia ya que estudios hechos por Tsujimoto et al. (1988) mostraron que este agente hidrofílico inactiva principalmente a los α_1 adrenérgicos sobre la superficie celular independientemente del subtipo y Guarino (1996) demostró que la sensibilidad de los subtipos de receptores depende en gran medida de las variaciones experimentales en los ensayos, así como del modelo celular en el que se esté trabajando.

VI. ANTECEDENTES

Se ha observado que la expresión de los receptores β -adrenérgicos tiene un patrón tejido-específico. por ejemplo. en hepatocitos pertenecientes a diferentes especies de animales se encuentra el mismo subtipo. así el β_2 se expresa tanto en hígado de cuyo (Arinze et al., 1983) como en hígado de rata y de conejo (Kawai et al., 1983).

Por otro lado estudios realizados en nuestro laboratorio. usando técnicas de biología molecular. farmacología y bioquímica demostraron que existe una heterogeneidad en la expresión de los α_1 -adrenérgicos en el hígado de diferentes especies (García-Sáinz et al., 1992). Se determinó que el subtipo α_{1A} se expresa en hígado de conejo. de perro y de humano; el subtipo α_{1B} en hígado del pez. de ratón. de rata. de pollo (García-Sáinz et al., 1995) y de hamster (García-Sáinz et al., 1994) y hay una coexpresión del α_{1A} y del α_{1B} adrenérgicos en el hígado del mono rezhus (García-Sáinz et al., 1996b).

Estudios realizados con membranas de hepatocitos de cuyo demostraron que el subtipo α_1 -adrenérgico que se expresa es insensible a la cloroetilclonidina. ya que la exposición del receptor a este agente no afecta el recambio de fosfoinosítidos: además se observó una alta afinidad del receptor por el ligando 5-metil-urapidil. así como el bloqueo de los efectos adrenérgicos en presencia de este antagonista. identificándolo como un receptor del subtipo α_{1A} . En los estudios correspondientes a su funcionalidad y regulación. se observó que estos receptores se acoplan a proteínas G insensibles a la

toxina pertusis y que los efectos de la activación del receptor son parcialmente independientes del calcio extracelular (García-Sáinz, et al., 1992a; 1992b).

En trabajos realizados posteriormente en nuestro laboratorio se identificó en membranas de hígado de cuyo un perfil farmacológico típico del receptor α_{1A} con el radioligando [3 H]5-metil-urapidil (García-Sáinz et al., 1993).

Igualmente en membranas de hepatocitos de diferentes especies (cuyo, rata y conejo) se observó que la tamsulosina es un antagonista muy potente para los receptores adrenérgicos α_1 , y particularmente con una mayor afinidad por los α_{1A} (García-Sáinz et al., 1995d).

Cabe aclarar que el subtipo α_1 adrenérgico expresado en hígado de cuyo ha sido especialmente difícil de caracterizar. por estudios farmacológicos y de unión de radioligandos se encontró la presencia del subtipo α_{1A} , sin embargo, al hacer el análisis de "Northern blot" se observó hibridación de RNA total con una sonda del DNA complementario de los receptores, lo que determinó que este es α_{1D} y no α_{1A} . Posteriormente un estudio realizado también en el laboratorio (González-Espinosa, et al. 1999) indicó que alteraciones del hígado tales como el proceso de disociación de los hepatocitos con colagenasa en donde hay digestión proteolítica de la matriz extracelular del hígado, provoca probablemente un cambio en la expresión del subtipo del receptor ya que el RNAm para α_{1A} normalmente expresado, es degradado y se incrementa el RNAm para el α_{1D} . De tal manera que para definir el subtipo α_1 controversial se trabajó en la clonación y secuenciación del receptor adrenérgico expresado en hepatocitos de cuyo. La clona del receptor se aisló a partir de RNA total de hígado de cuyo, la cual presenta un marco de lectura abierta de 1401 pb que codifica una proteína de 466

aminoácidos. con un estimado peso molecular para esta secuencia de aproximadamente 51.5 kDa.

El trabajo que se presenta en esta tesis consiste en lograr la expresión del receptor clonado de hígado de cuyo. su caracterización farmacológica y la realización de pruebas funcionales que ayuden a identificar el subtipo al que pertenece.

HIPÓTESIS

Si el receptor α_1 clonado de hepatocitos de cuyo. pertenece al subtipo α_{1a} y tiene una integridad estructural y funcional. entonces los parámetros farmacológicos corresponderán a los reportados previamente para el receptor α_{1A} de hepatocitos de cuyo. e incluso podrá activar la vía de transducción de fosfoinosítidos-calcio en respuesta a los estímulos adecuados.

OBJETIVOS

GENERALES:

- Caracterizar farmacológicamente al receptor α_1 -adrenérgico clonado de hígado de cuyo y transfectado en células Cos-1.
- Comprobar la integridad funcional del receptor expresado en células Cos-1.

PARTICULARES:

- Determinar el valor de la constante de disociación (K_d) y el pegado máximo (B_{max}) del receptor clonado, por ensayos de asociación de los ligandos marcados [3H] Prazosina y [3H] Tamsulosina.
- Determinar el efecto del agente alquilante cloroetilclonidina en el receptor.
- Determinar el valor de la constante de inhibición (K_i) de los ligandos: oximetazolina, epinefrina, norepinefrina, metoxamina, prazosina, 5metilurapidil, benoxatán, fentolamina y BMY 7378 con el receptor clonado, por ensayos de competencia con el radioligando [3H] Tamsulosina.
- Cuantificar el efecto sobre la producción de fosfatos de inositol en células Cos-1 transfectadas con el receptor clonado, en respuesta a epinefrina $10 \mu M$ tanto en ausencia como en presencia de prazosina $1 \mu M$.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

Se utilizó el plásmido pCDNA que tiene la secuencia codificante para el receptor clonado α_{1a} de hígado de cuyo: el plásmido pCH110 que contiene a la β -galactosidasa para evaluar la eficiencia de la transfección: se utilizó la cepa de bacterias competentes JM103 para transformar con el cDNA del receptor y las células Cos-1 para la transfección y expresión del receptor.

La [3 H]prazosina (77.9 Ci/mmol) y el [2,3- 3 H]myo-inositol (22.9 Ci/mmol) fueron de New England Nuclear. La [3 H]tamsulosina (56.3 Ci/mmol) la proporcionó Yamanouchi Europe y la fentolamina Ciba Geigy. la metoxamina la proporcionó Burroughs-Wellcome. El Benoxatán. 5-metil-urapidil. cloroetilclonidina y WB-4101 fueron obtenidos de Research Biochemicals International. La (-)-Epinefrina. (-)-norepinefrina. oxymetazolina y la prazosina se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El Tris-HCl. EDTA (etilendiamina-ácido tetraacético). RNAasa. NaOH. ampicilina. cloranfenicol. MOPS (ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfónico). triton X-100. etanol. isopropanol. cloroquina. DEAE-dextrán. $MgCl_2$. HEPES (ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N-[2-etanosulfónico). pirofosfato de tetrasodio. β -glicerofosfato. Folin-fenol. albúmina de suero fetal bovino. PPO (Na_3VO_4 . 2,5-Difeniloxazol) y los inhibidores de proteasas: leupeptina. PMSF (fenilmetilsulfonyl fluoruro). inhibidor de tripsina y bacitracina se obtuvieron también de Sigma Chemical Co. Las columnas usadas en la purificación del plásmido son de Qiagen. La agarosa. la resina AG1X-8 y el SDS son de

Bio Rad. El DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), el suero fetal bovino, la tripsina, antibióticos y antimicóticos (estreptomina, penicilina y anfotericina) usados para el cultivo celular: la peptona y el extracto de levadura fueron de Gibco BRL. La X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido), substrato cromogénico para la β -galactosidasa, se obtuvo de Sigma Chemical Co.

II. Métodos

II.1 Transformación de bacterias y purificación de plásmido.

La transformación de las bacterias competentes JM103 se realizó a 4° C por una hora y en condiciones de esterilidad. Se agregaron .015 μ g del plásmido que contiene la secuencia que codifica para el α_{1a} clonado de hígado de cuyo a bacterias competentes. Transcurrido el tiempo se dió un choque térmico de 42° C durante 90 s. después del cual se agregó 1 ml de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron a 37° C durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 834 xg durante 5 m y el paquete de bacterias se resuspendió en 150 μ l de LB con ampicilina (0.25 g/ml) (LB-amp.). Las bacterias se plaquearon en una caja con medio LB y se dejaron a 37° C toda la noche.

Para el precultivo, de la caja con bacterias transformadas se tomó una colonia aislada que se sembró en 5 ml de medio LB-amp. (0.25 g/ml) y se incubó en agitación a 37° C toda la noche. El cultivo de las bacterias transformadas se hizo en 500 ml de medio LB-amp. a 37° C inoculado con 5 ml del precultivo hasta que la densidad óptica debido al crecimiento de la población fue de entre 0.6 y 0.9 unidades de absorbancia a 660 nm. Al cultivo se le agregaron 90 mg de cloranfenicol y se dejó toda la noche incubando a 37° C.

La purificación de plásmido se hizo por el procedimiento de la compañía Qiagen basado en el método de óptima lisis alcalina de Birboim y Doly (1979) (Qiagen, 1998). El cultivo se centrifugó a 5873 xg durante 15 minutos a 4° C y se resuspendió totalmente el paquete de bacterias en 50 ml de solución P1 (Tris-HCl 50 mM, pH8.0: EDTA 10 mM) con RNAsa (0.1mg/ml). Posteriormente, 50 ml de solución P2(NaOH 200 mM, 1% SDS) se mezclaron con el cultivo e incubaron a 25° C por 5 m. Se agregaron 50 ml de solución fría P3 (acetato de potasio 3 M, pH 5.5) se mezclaron y se incubaron por 30 m a 4° C. posteriormente se centrifugó a 19.732 xg durante 30 m a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se filtró. Éste sobrenadante se aplicó 2 veces en una columna previamente equilibrada con 35 ml de la solución QBT (NaCl, 750 mM: MOPS, 50 mM, pH 7: etanol 15 %: Tritón X-100, 0.15 %). Si se trataba de columnas usadas entonces se regeneraba con 50 ml de solución HS (NaCl 1.5 M: MOPS, 50 mM: etanol 20 %), 20 ml de solución QPT (NaCl, 0.4 M: MOPS 50 mM pH 7: tritón X-100, 0.15 %) y 35 ml de de la solución QBT. Después la columna se lavó con 200 ml de la solución QC (NaCl, 1M: MOPS, 50 mM, pH 7: etanol, 15 %). El plásmido unido a la columna se eluyó con 35 ml de la solución QF (NaCl, 1.25 M: Tris-HCl, 50 mM, pH 8.5: etanol 15 %). posteriormente se precipitó con 24.5 ml de isopropanol, se centrifugó a 27.135 xg durante 30 m. El sobrenadante se desechó y el paquete de ADN se lavó con 7 ml de etanol al 70 %, se centrifugó nuevamente durante 15 m a 27.135 xg, se decantó y el DNA (plásmido) se dejó secando durante 2 días, posteriormente se resuspendió con 200 µl de agua estéril y se mantuvo en congelación.

La concentración del plásmido se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia registrada en el espectrofotómetro con luz UV a 240 nm es igual a 50 µg · µl. La cantidad del DNA se determinó en geles agarosa al 1 % y revelando con el intercalador de DNA bromuro de etidio.

II.2 Cultivo celular y transfección

Se cultivaron células de riñón de mono Cos-1 en un medio de alta concentración de glucosa, con L-glutamina y clorhidrato de piridoxina en DMEM suplementado con 3.7 g de NaHCO_3 por litro con un pH de 7.4 y filtrado para su esterilización, posteriormente complementado con un 10 % de suero fetal de bovino, y con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin, 100 U/ml de penicilina y 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anfotericina, en cajas Petri de 10 cm a una temperatura de 37° C y una atmósfera con 5 % CO_2 .

Para lavar las células se usaron 10 ml por caja de una solución amortiguadora estéril de fosfatos salinos PBS (NaCl 8.7g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.7g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g; pH 7.4, para un litro). Para levantar las células de la caja de cultivo se usaron 0.5 ml de tripsina al 0.3 % por caja durante 4 m parando la reacción de la tripsina con DMEM completo (Vázquez- Prado et al., 2000).

Antes de hacer la primera transfección el cultivo se levantó con tripsina y se dejó crecer de nuevo, esta resiembra se repitió por lo menos tres veces. Para la transfección se usaron células entre un 80-90 % de confluencia sembradas el día anterior. Las células se lavaron y homogenizaron 2 veces con 4 ml DMEM sin suero y se incubaron durante 2.5 h a 37° C en un medio de transfección que contenía por caja, 2 μg de plásmido, 4 ml de DMEM sin suero, 40 μl de cloroquina 2.5 mM y 80 μl de DEAE-dextran (10 mg/ml). Después, el medio de transfección se retiró y las células se lavaron 2 veces con 4 ml de DMEM sin suero cada vez, posteriormente se adicionó medio DMEM completo. Las células se incubaron entre de 48 y 72 horas, período de tiempo en el que se recuperaban y expresaban de manera transitoria y óptima al receptor clonado de hígado de cuyo. La

eficiencia de transfección fue de 50-60 % y se determinó por la transfección paralela de células Cos-1 con el plásmido pCH110, evaluándose por la actividad de la β -galactosidasa.

II.3 Purificación de membranas

Después de 48 a 72 h de la transfección, las células se lavaron con 10 ml de PBS frío, la solución amortiguadora se aspiró y las cajas se colocaron sobre hielo. A cada caja se le agregaron 500 μ l de solución de lisis fría (Hepes 20 mM pH 7.5; EDTA 5 mM, pirofosfato de sodio 10 mM; Na_2VO_4 100 μ M; β -glicerofosfato 10 mM; PMSF disuelto en isopropanol 100 μ g/ml; MgCl_2 2 mM, inhibidores de proteasas (leupeptina, 20 μ g/ml; bacitracina, 500 μ g/ml e inhibidor de tripsina 20 μ g/ml)) y se dejaron incubando a 4° C por 15 m o más tiempo. El lisado celular se recuperó y se depositó en un homogenizador. Para aprovechar los restos del lisado que quedaban en la caja se agregaron 500 μ l más de la solución de lisis y se depositaron con el anterior.

El homogenado se centrifugó a 1.650 xg durante 20 m a 4° C. El sobrenadante se recuperó y centrifugó a 30.950 xg durante 20 m a 4° C. El sobrenadante se desechó y el paquete se resuspendió con 500 μ l de solución de lisis, se centrifugó durante 5 m a 17.361 xg a 4° C, posteriormente se decantó. Al final las membranas se conservaron en ultracongelación. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951).

II.4 Estudios de asociación de ligandos radioactivos en membranas plasmáticas.

Para los experimentos de saturación, las incubaciones se hicieron por triplicado con 6 distintas concentraciones del radioligando [^3H]prazosina entre 0.05 y 10 nM, lo mismo para el radioligando [^3H]tamsulosina entre 0.01 y 4 nM (en ausencia o en presencia de fentolamina 10 μM para determinar el pegado específico). En todos los casos se utilizaron 20 μg de proteína de membranas que se llevaron a un volumen final de 0.25 ml en una solución de MgCl_2 10 mM y trizma base 50 mM a pH 7.5. Además se tomaron alícuotas de la cantidad total de radioligando por muestra para obtener las cuentas totales en cada ensayo.

Los experimentos de competencia se hicieron por triplicado con la misma concentración de 0.3 a 0.6 nM del radioligando [^3H]tamsulosina y siempre en presencia de 6 distintas concentraciones de cada agonista (epinefrina, norepinefrina, oximetazolina y metoxamina) o de cada antagonista (prazosina, benoxatán, 5-metil-urapidil, BMY 7378 y fentolamina). Para determinar el pegado total el ensayo se realiza en ausencia de competidor con 20 μg de proteína en un volumen final de 0.25 ml con solución de MgCl_2 . También se tomaron alícuotas de la cantidad total de radioligando por muestra para obtener las cuentas totales.

El ensayo consistió en incubaciones con duración de 50-60 m a 30° C en agitación. La incubación terminó por la adición de 5 ml de solución de trizma MgCl_2 frío y filtrado rápido a través de filtros GF/C (hidratados previamente con solución de trizma MgCl_2) usando un aparato de filtración Brandel modelo M-48. Los tubos se lavaron 4 veces, posteriormente cada filtro se colocó en un vial al que se le agregaron 4 ml de líquido de

centelleo (3g de PPO, 106 ml de etanol, 37 ml de etilenglicol, 257 ml de tritón y 600 ml de xileno para un litro). La radioactividad por muestra se midió en desintegraciones por minuto (dpm) en un contador Beckman LS 600 SC programado para contar tritio durante un minuto por vial. Las curvas se analizaron por el programa EBDA Biosoft-Elsevier (Munson y Rodbard, 1980).

Se hicieron también saturaciones con membranas incubadas con el agente alquilante cloroetilclonidina 100 μM durante 15 m. en un baño de agua a 37° C en agitación. Estas se lavaron 2 veces mediante centrifugación 27.135 xg durante 10 m. se resuspendieron y homogenizaron con 12 ml de solución de trizma MgCl_2 antes del estudio de asociación con los distintos radioligandos.

II.5 Purificación de fosfatos de [^3H]inositol

Células Cos-1 cultivadas en cajas de seis pozos se transfectaron al llegar a un 70-80 % de confluencia con 1 μg de plásmido, 1 ml de DMEM sin suero, 10 μl de cloroquina y 20 μl de DEAE-dextrán por pozo para continuar con la transfección como se describió previamente. Cuarenta y ocho horas después se marcaron en un medio DMEM sin inositol que contiene [2.3 ^3H]myo-inositol (5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) por 18-24 h a 37° C y en una atmósfera con 5 % de CO_2 . En el día del experimento las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS por pozo y se incubaron con 2 ml de un medio de Krebs-Ringer-HEPES con Ca^{2+} 1.3 M y LiCl 20mM por pozo durante aproximadamente 20 m en la incubadora a 37° C y una atmósfera de CO_2 al 5%.

Las células se estimularon con epinefrina 10 μM o con epinefrina 10 μM más prazosina 1 μM durante 15 m a 37° C y una atmósfera con 5 % de CO_2 . La estimulación

se terminó adicionando 400 μ l de ácido perclórico frío al 30 %. El material celular se neutralizó con una solución de KOH 1.5 M y HEPES 75 mM y se centrifugó a 8.754 xg durante 10 m. El sobrenadante de cada tubo se aplicó a una columna de 10 ml con cama de resina AG1-X8 (forma formato) hidratada. Posteriormente se agregaron 5ml de Krebs-Ringer-HEPES con LiCl 20 mM y Ca^{2+} 1.3 M a cada columna y el filtrado se desechó. Los fosfatos de [^3H]inositol (IP₁, inositol monofosfato; IP₂, inositol bifosfato; IP₃, inositol trifosfato) se separaron por la cromatografía de Dowex AG1-X8 (Berridge et al., 1983) adicionando a cada columna 2 ml de la solución correspondiente 5 veces (recuperando en viales las primeras tres fracciones y desechando las dos últimas): para eluir GPI (solución de borato de sodio 5 mM y formato de sodio 50 mM); para eluir IP₁ (solución de borato de sodio 5mM y formato de sodio 180 mM); para IP₂ (solución de ácido fórmico 0.1 M y formato de amonio 0.4 M) y para IP₃ (solución de ácido fórmico 0.1 M y formato de amonio 1 M). A cada vial se le agregaron 4 ml de líquido de centelleo y agua para tener la muestra en solución. La cantidad de radioactividad de las muestras se midió en un contador Beckman LS 600 SC programado para contar tritio durante 1 minuto por vial.

II.1 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS
Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO

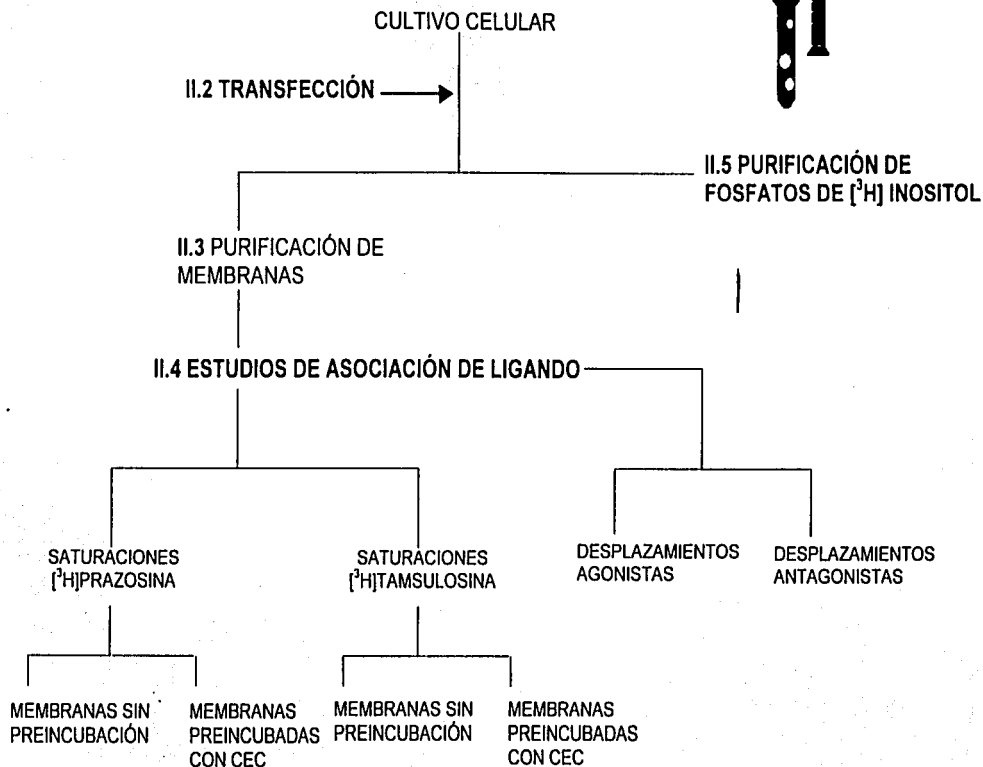


Fig. VII. Esquema general de experimentos.

RESULTADOS

I. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN CON UN LIGANDO RADIOACTIVO

SATURACIONES UTILIZANDO [³H] PRAZOSINA Y [³H] TAMSULOSINA

En la figura 1. panel A se observa una curva de saturación típica para la interacción ligando-receptor al utilizar [³H]prazosina. La curva que relaciona la concentración de [³H]prazosina pegada contra la [³H]prazosina total tiene una forma hiperbólica rectangular. Cuando todos los sitios de asociación están ocupados ya no se observa un aumento en el pegado específico, aunque se incremente la concentración de ligando.

En la figura 1. panel B se muestra el análisis de esta saturación al aplicar la transformación de Scatchard (regresión lineal), resultando en una gráfica que compara la concentración de [³H]prazosina pegada (efecto) contra la relación [³H]prazosina pegada/[³H]prazosina libre (efecto/concentración de radioligando libre). La gráfica resultante corresponde a una línea recta, lo que muestra un comportamiento consistente con las asociaciones de una población de un solo tipo de receptor: una pendiente que corresponde al valor de $-1/K_d$ y un valor de intersección en el eje de las x que corresponde al número de receptores o pegado máximo (B_{max}), valores que se obtuvieron del valor promedio de 5 experimentos \pm el error estandar de los parámetros obtenidos en las saturaciones con el radioligando [³H]prazosina y que indican una afinidad relativamente baja, con una $K_d = 0.57 \pm 0.09$ nM y un pegado máximo o $B_{max} = 779.6 \pm 80$. Los análisis aplicados a estos experimentos muestran un pegado inespecífico muy alto, equivalente al 40% del pegado total de la K_d .

Al utilizar el radioligando [^3H]tamsulosina, se observa una curva que muestra la saturación de los sitios de unión al radioligando. Al igual que la saturación con [^3H]prazosina tiene una forma hipérbolica rectangular (Fig 2. panel A).

La transformación de Scatchard de esta saturación se muestra en la figura 2. panel B. Los resultados que se obtuvieron con el radioligando [^3H]tamsulosina (valor promedio de 4 experimentos \pm el error estandar) son: $K_d = 0.058 \pm 0.001$ nM, con un pegado específico muy alto (95 %) y $B_{\max} = 548.7 \pm 83.3$.

Al utilizar membranas de las células transfectadas con el receptor α_1 clonado y expresado en células Cos-1 en estos ensayos de asociación con los ligandos [^3H]prazosina y [^3H]tamsulosina, se observa una asociación específica y saturación de ambos radioligandos (fig. 1 panel A y fig. 2 panel A).. Al hacer la transformación lineal o Scatchard para las saturaciones se obtienen en ambos casos, dos gráficas con líneas rectas, lo que indica que se trata de una población homogénea de receptores. (fig. 1 panel B y fig. 2 panel B). Los valores obtenidos de estos parámetros se muestran en el cuadro 1. En las células Cos-1 sin transfectar con el cDNA del receptor α_1 no se ve pegado específico.

II. SENSIBILIDAD AL AGENTE ALQUILANTE CLOROETILCLONIDINA

Debido a que el receptor α_{1A} de hígado de cuyo presenta insensibilidad a la cloroetilclonidina (CEC) (García-Sáinz et al., 1992a) se probó el efecto de este agente alquilante en el receptor clonado. Los experimentos de asociación de ligando radioactivo, tanto [^3H]prazosina como [^3H]tamsulosina se realizaron en membranas preincubadas durante 15 minutos a 37°C con CEC (100 μM). Para [^3H]prazosina el cambio de la afinidad con el agente alquilante va de una $K_d = 0.62 \pm 0.15$ nM a una $K_d = 1.007 \pm 0.21$ nM (fig. 3). sin embargo al aplicar una prueba "t de Student" a valores obtenidos de 4 experimentos

independientes se determinó que esta discreta caída en la afinidad no es estadísticamente significativa

Por otro lado, cuando las pruebas se realizaron con [^3H]tamsulosina, los valores de las constantes de disociación, de un promedio de 8 experimentos, fueron: $K_d = 0.115 \pm 0.016$ nM para el control, y una $K_d = 0.147 \pm 0.028$ nM para la asociación obtenida en membranas preincubadas con el agente CEC (fig. 4).

Con respecto a los valores obtenidos del pegado máximo ante la preincubación con CEC, se puede apreciar una disminución en ambos radioligandos. Con [^3H]prazosina el valor de la B_{max} cambia de 1078 ± 291 fmol/mg de proteína a 730 ± 225 fmol/mg, obteniéndose un porcentaje de caída del $33.6 \pm 10.58\%$. En la figura 3 se puede observar el efecto de la preincubación tanto en las curvas de saturación (panel A) como en la transformación de Scatchard (panel B), las gráficas que se muestran corresponden a los datos obtenidos de un experimento representativo.

Cuando se usó [^3H]tamsulosina, la caída en el valor de la B_{max} ante la preincubación con CEC es del $24.8 \pm 4.6\%$, ya que la B_{max} determinada para los 8 experimentos cambia de 981 ± 187 fmol/mg de proteína para el control a 716.6 ± 127 fmol/mg para las membranas preincubadas con CEC. En la figura 4 se pueden ver las curvas de un experimento representativo de este ensayo.

Al aplicar la prueba de t ($P > 0.05$), la caída en la afinidad y en el pegado máximo con ambos radioligandos no es significativa. Los parámetros obtenidos de estos ensayos se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1

Parámetros de pruebas de asociación de ligandos y efecto de preincubación con cloroetilclonidina.

Receptor adrenérgico α_{1A} de hígado de cuyo				
	$[^3\text{H}]\text{PRAZOSINA}$	$[^3\text{H}]\text{PRAZOSINA}$	$[^3\text{H}]\text{TAMSULOSINA}$	$[^3\text{H}]\text{TAMSULOSINA}$
	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg prot.)	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg prot.)
Temperatura máxima 32° C				
Saturación	$0.57 \pm .09$	779.6 ± 80	0.058 ± 0.001	548.7 ± 83.3
Temperatura máxima 37° C				
Saturación Control	0.62 ± 0.15	1078 ± 291	0.115 ± 0.016	981 ± 187
Saturación Cloroetilclonidina	1.007 ± 0.21	730 ± 225	0.147 ± 0.028	716.6 ± 127

En el primer caso los datos son promedios \pm S.E. de 5 experimentos para prazosina y 4 para tamsulosina usando diferentes preparaciones de membrana. Para los experimentos de asociación de ligandos donde se preincubó con cloroetilclonidina y su control los datos son promedios de 4 experimentos para prazosina y de 8 para tamsulosina.

III. DESPLAZAMIENTOS UTILIZANDO [³H]TAMSULOSINA

Al observar que la [³H]tamsulosina tuvo un pegado específico muy alto se decidió continuar la caracterización con este ligando. Para obtener el perfil farmacológico del receptor clonado se realizaron experimentos de competencia con distintos agonistas y antagonistas.

En el cuadro 2 se indican las constantes de inhibición (K_i) promedio \pm el error estandar obtenidas de los experimentos de competencia realizados para cada compuesto. El orden de potencia que se obtuvo en los desplazamientos para los agonistas es: oximetazolina $K_i \approx 126$ nM > epinefrina $K_i \approx 1356$ nM > norepinefrina $K_i \approx 3247$ nM > metoxamina $K_i \approx 6536$ nM (fig. 5); y para los antagonistas es: prazosina $K_i \approx 0.78$ nM \geq 5 metil urapidil $K_i \approx 1.83$ nM = benoxatán $K_i \approx 1.93$ nM > fentolamina $K_i \approx 7.16$ nM >> BMY $K_i \approx 1156$ nM (fig. 6).

Al comparar los valores de pK_i obtenidos de los desplazamientos con [³H]tamsulosina con los datos del receptor adrenérgico α_{1A} de hepatocitos de cuyo reportados en el trabajo de García Sainz et al. (1995) se obtuvo una gráfica de correlación con una recta que tiene una pendiente = 0.79 y una $r^2 = 0.88$ (fig. 7).

CUADRO 2

Parámetros de estudios de competencia con [³H] tamsulosina.

Receptor adrenérgico α_{1a} de hígado de cuyo

AGENTE	K_i (nM)	Pendiente
Agonistas		
Oximetazolina	126.3 ± 51.3	0.97 ± 0.08
Epinefrina	1356 ± 374	0.84 ± 0.07
Norepinefrina	3247 ± 573	0.85 ± 0.06
Metoxamina	6536 ± 1638	0.72 ± 0.08
Antagonistas		
Prazosina	0.78 ± 0.13	0.93 ± 0.18
5-metil-urapidil	1.83 ± 0.33	1.0 ± 0.06
Benoxatán	1.89 ± 0.63	0.91 ± 0.13
Fentolamina	7.16 ± 1.35	0.85 ± 0.06
BMY7378	1156 ± 68	1.08 ± 0.07

Los experimentos se hicieron con membranas purificadas de células COS1 transfectadas con el receptor α_{1a} adrenérgico de hígado de cuyo. Los resultados son promedios ± S.E. (n = 3 para fentolamina, BMY, 5-metil-urapidil y prazosina; n = 4 para benoxatán; n = 5 para epinefrina y metoxamina; n = 6 para oximetazolina y norepinefrina).

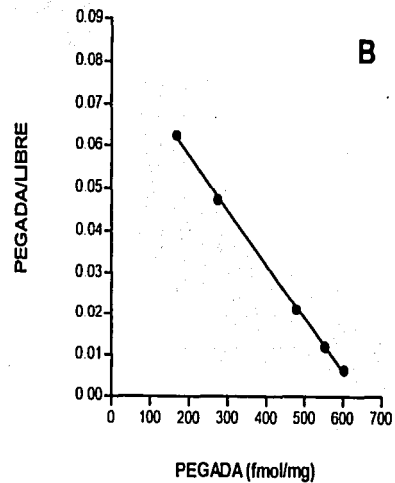
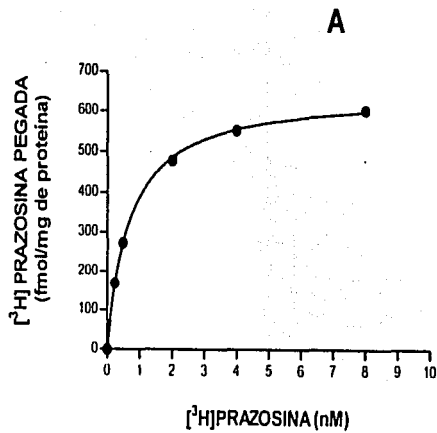


Fig. 1. Curva de saturación con [³H] prazosina, usando membranas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1a} -adrenérgico de hígado de cuyo (panel A). Transformación de Scatchard a partir de la saturación (panel B).

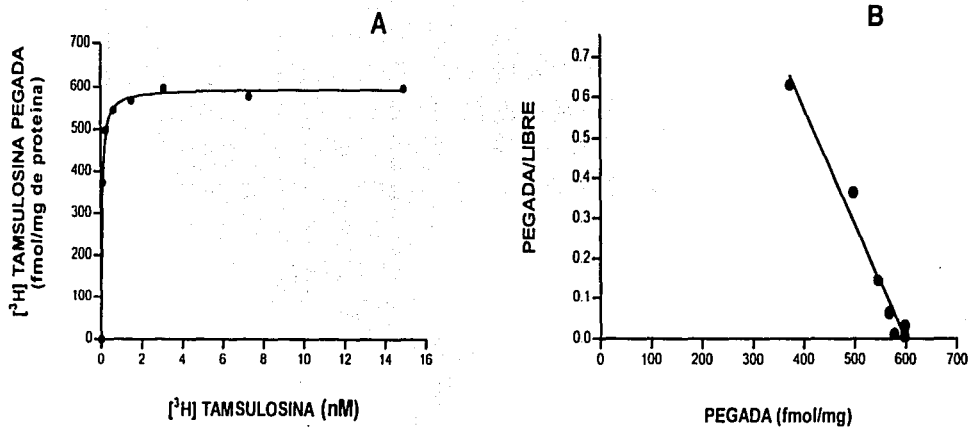


Fig.2. Curva de saturación con [³H] tamsulosina, usando membranas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1a} -adrenérgico de hígado de cuyo (panel A). Transformación de Scatchard de la saturación (panel B).

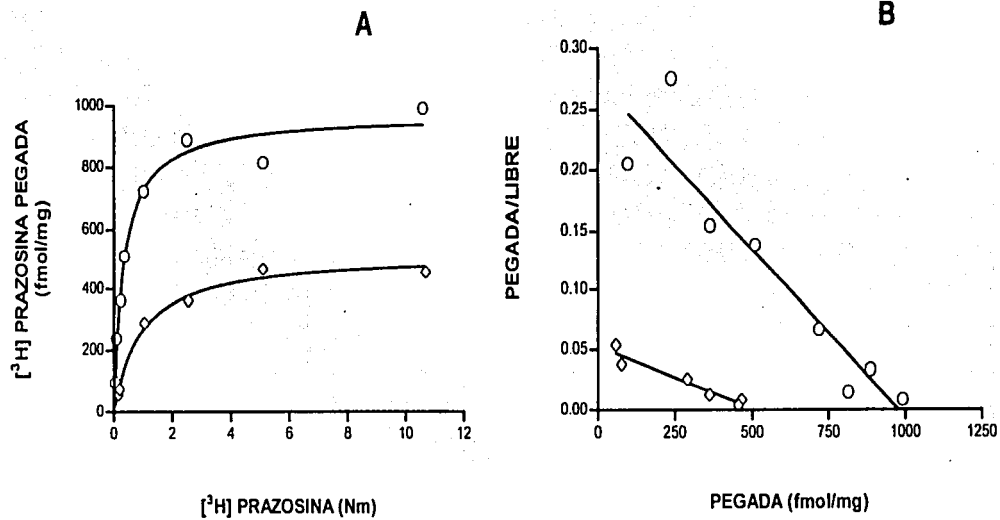


Fig. 3. Curvas de saturación en el panel A) y Scatchard en el B) hechos con [³H] prazosina, usando membranas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1A} -adrenérgico de hígado de cuyo donde se ve el efecto de la preincubación con CEC. Control (círculos vacíos); CEC (diamantes vacíos).

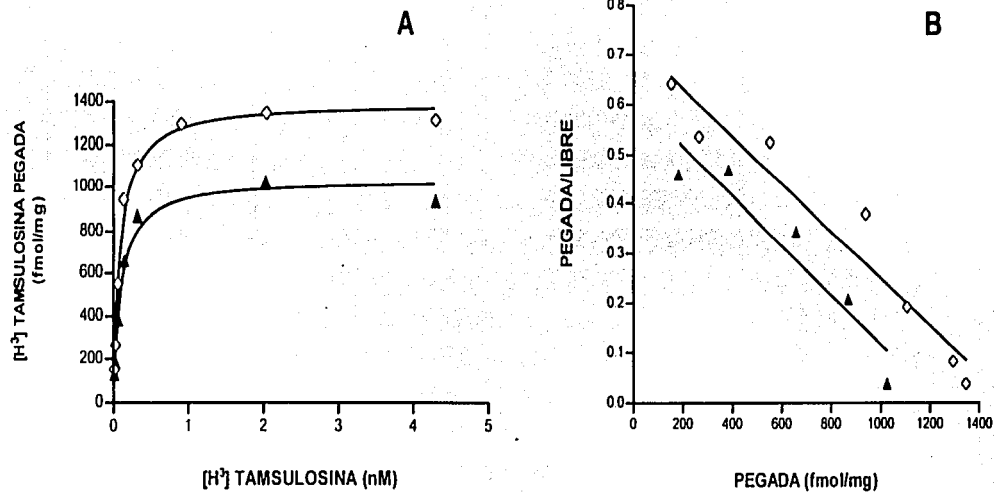


Fig.4. Curvas de saturación en el panel A) y Scatchard en el panel B) hechos con [³H] tamsulosina, usando membranas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1a} -adrenérgico de hígado de cuyo donde se ve el efecto de la preincubación con CEC (triángulos rellenos) y su control (diamantes vacíos).

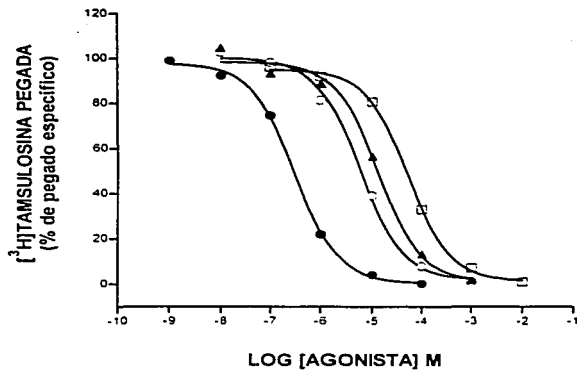


Fig. 5. Experimentos de competencia de diferentes agonistas con [³H] tamsulosina usando membranas purificadas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1a} -adrenérgico de hígado de cuido. Oximetazolina (círculos rellenos), epinefrina (círculos vacíos), norepinefrina (triángulos rellenos) y metoxamina (cuadros vacíos). Los datos que se presentan en la gráfica son de curvas representativas.

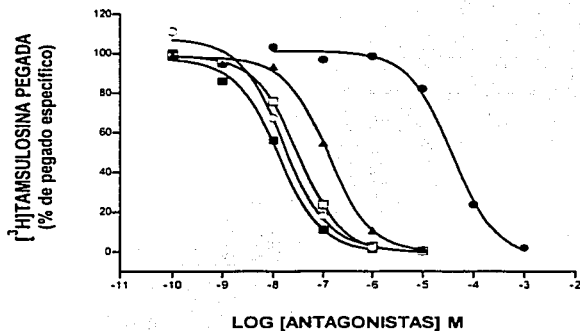


Fig. 6. Experimentos de competencia de diferentes antagonistas con [³H] tamsulosina usando membranas de células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{1a} -adrenérgico de hígado de cuyo. Benoxatián (cuadros rellenos), 5-metil-urapidil (cuadros vacíos), prazosina (círculos vacíos) fentolamina (triángulos rellenos) y BMY (círculos rellenos). Los datos son de curvas representativas.

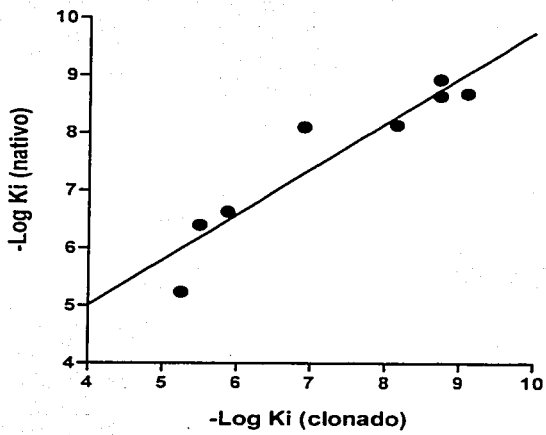


Fig. 7. Curva de correlación. Los datos del receptor nativo fueron tomados de García Sáinz et. al., 1995.

IV. PURIFICACIÓN DE FOSFATOS DE INOSITOL

Debido a que la unión de ligandos con los receptores α_1 adrenérgicos activan al sistema de fosfoinosítidos-calcio, se comprobó la integridad funcional del receptor clonado, mediante el registro de la producción de los fosfatos de inositol (IP_3 , IP_2 e IP_1) ante el estímulo de epinefrina $10 \mu M$.

Con el método de purificación por cromatografía de intercambio iónico se observó un incremento de alrededor del 151 % en la producción de IP_3 en las células estimuladas con epinefrina con respecto al basal (fig. 8 panel A). El inositol que se acumuló en mayor cantidad es el IP_2 , que como se observa en la figura 8 panel B, se incrementa el nivel en aproximadamente 403 % con respecto al basal. En las células estimuladas, el inositol monofosfato (IP_1) registra un incremento de aproximadamente 204 % con respecto al basal (fig. 8 panel C).

Cuando las células se estimularon con epinefrina $10 \mu M$, en presencia del antagonista prazosina $1 \mu M$, no hubo respuesta del receptor. (fig. 8 panel A, B y C).

El incremento de los fosfatos de inositol totales (IP total) es de 289.2 ± 34.2 % con respecto al basal (fig. 9) y el efecto de la estimulación con epinefrina $10 \mu M$ se abate casi totalmente en presencia de prazosina $1 \mu M$. Al aplicar un análisis de varianza de una vía (ANOVA) se determinó que existe una diferencia significativa entre los niveles de fosfatos de inositol totales, en las tres distintas condiciones.

En la figura 10 se puede observar el perfil de elución de un experimento representativo, donde se muestra la cantidad de inositoles obtenidos en cada fracción eluida. Se observa el valor basal, el incremento de estos con epinefrina $10 \mu\text{M}$ y el efecto bloqueador del antagonista prazosina.

Como control los experimentos se realizaron también con células no transfectadas. Ante el estímulo con el agonista no se observó incremento en los niveles de fosfatos de inositol (No se muestran las gráficas).

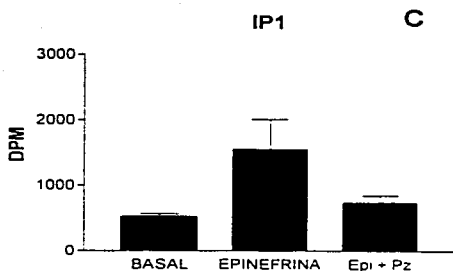
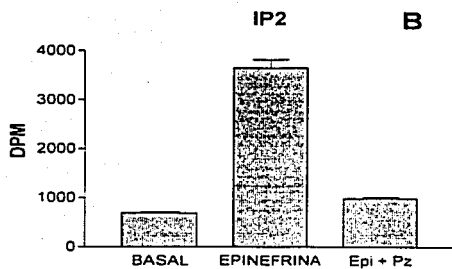
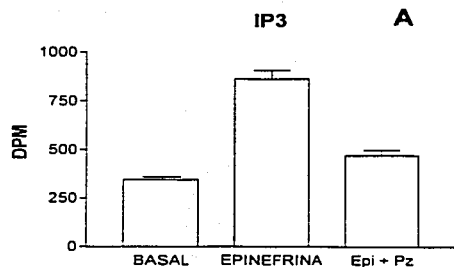


Fig. 8. Efecto de la epinefrina en la producción de fosfatos de inositol IP₃, IP₂ E IP₁. Se estimularon las células con epinefrina 10 μ M en ausencia y presencia de prazosina 1 μ M. Se muestra la suma de las fracciones correspondientes a cada uno de ellos. El incremento en la producción de fosfatos de inositol fue significativo ante el estímulo de epinefrina provocando un incremento del 151 \pm 20 % para IP₃ (panel A) 433 \pm 42 % para IP₂ (panel B) y del 204 \pm 99 % para IP₁ (panel C) con respecto al basal (n = 5). En presencia del antagonista prazosina el efecto de la epinefrina fué bloqueado. Mediante pruebas de ANOVA de una vía, se determinó que tanto los niveles de IP₃ (P<0.0001; F=74.24) como de IP₂ (P<0.0001; F=278) en las tres diferentes condiciones, presentan diferencias significativas. Los niveles de IP₁ (P=0.0509; F=3.86) no presentan diferencias estadísticamente significativas al aplicar este mismo análisis.

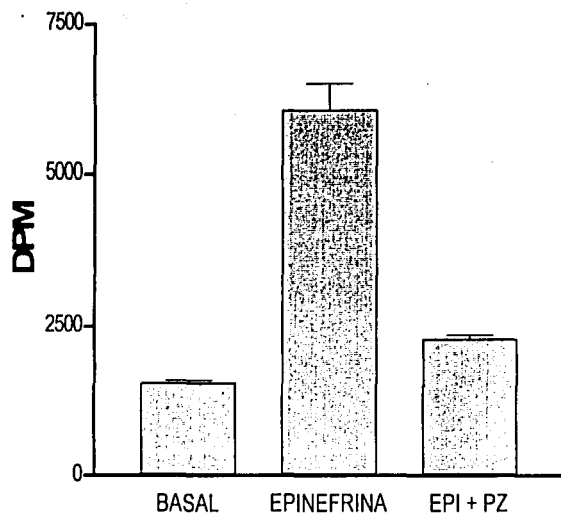


Fig. 9. Efecto de la epinefrina en la producción de fosfatos de inositol. Se estimularon las células con epinefrina $10\mu\text{M}$ en ausencia y presencia de prazosina $1\mu\text{M}$ durante 15 minutos a 37°C . Se muestra la producción de fosfato de inositol totales (IP_3 , IP_2 e IP_1). El incremento en la producción de fosfatos de inositol fue significativo ante el estímulo de epinefrina provocando un incremento del $289.2 \pm 34.2\%$, con respecto al basal ($n = 5$). En presencia del antagonista prazosina el efecto de la epinefrina fue bloqueado. Mediante la prueba de ANOVA ($P < 0.0001$; $F = 87.21$) se determinó que existe una diferencia significativa entre los niveles de inositol totales, en las tres distintas condiciones.

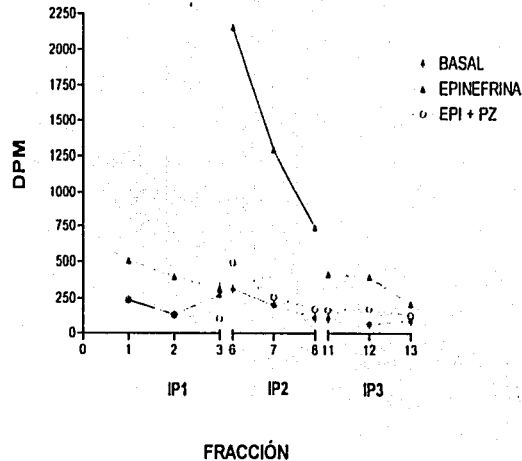


Fig. 10. Perfil de elución de los fosfatos de inositol. Células Cos-1 transfectadas con el receptor α_{12} -adrenérgico de hígado de cuyo estimuladas con epinefrina $10 \mu\text{M}$, en ausencia o en presencia de prazosina $1 \mu\text{M}$, las fracciones de IP_1 (1, 2 y 3), IP_2 (6, 7 y 8) y de IP_3 (11, 12 y 13) se separaron por cromatografía de intercambio iónico (las fracciones 4 y 5; 9 y 10; 14 y 15 se desechan). El efecto del estímulo con respecto al basal fue mayor en la producción de inositol 1,4-bisfosfato, también se observa un aumento en la producción de inositol monofosfato y de inositol 1,4,5-trifosfato. El efecto de la epinefrina fue bloqueado casi totalmente por la prazosina. Los datos son de un experimento representativo.

DISCUSIÓN

Al realizar ensayos de asociación a un ligando radioactivo (binding), se obtuvo el perfil farmacológico del receptor α_1 adrenérgico clonado de hepatocitos de cuyo, que mediante transfección este receptor se expresó de manera temporal en células Cos-1. Los resultados indican que el receptor clonado pertenece al subtipo α_{1A} y que tiene una alta afinidad y una asociación rápida, específica y saturable con los radioligandos utilizados: [3 H]prazosina y [3 H]tamsulosina, lo que es consistente con las características que definen a la cinética de asociación entre un receptor y su ligando (Hulme, 1990).

Los valores determinados en este trabajo, muestran claramente una alta afinidad del receptor por el ligando [3 H] tamsulosina con una $K_d \approx 0.058$ nM y con un pegado específico > 95 %. Lo anterior es consistente con lo reportado por García-Sáinz, et al., (1995), en donde se reporta una $K_d = 0.07 \pm 0.01$ nM, valor que se obtuvo de pruebas de asociación del receptor α_{1A} adrenérgico en membranas de hígado de cuyo con el mismo radioligando. En dicho estudio se concluye que el radioligando [3 H]tamsulosina es un potente antagonista selectivo para los subtipos α_1 adrenérgicos y que interactúa con mayor afinidad para los α_{1A} que para los α_{1B} .

En el caso de los experimentos realizados con el otro antagonista, el radioligando [3 H]prazosina, el valor que se obtuvo de la K_d es ≈ 0.57 nM, con un pegado inespecífico del ≈ 40 %, mayor al observado con el agente [3 H]tamsulosina (cuadro 1 figs. 1 y 2). En estudios realizados con este ligando García-Sainz (1992)

encuentra que en los experimentos en los que se analizan membranas de hígado de distintas especies (cuyo, rata y conejo), la prazosina no tiene selectividad por los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, resultados consistentes con el reporte de Mante y Minneman (1991). En 1995 García-Sáinz y colaboradores ya mencionan algunos problemas al utilizar a la [3 H]prazosina para obtener datos de la cuantificación y caracterización del receptor α_{1A} de hígado de cuyo, debido al alto pegado inespecífico que se obtiene al trabajar con este agente.

Al analizar las curvas de saturación obtenidas, la transformación de Scatchard muestra que los radioligandos [3 H]prazosina y [3 H]tamsulosina tienen un comportamiento lineal, lo que indica que la población de receptores es homogénea (Attie y Raines, 1995) (Fig. 1 panel B y 2 panel B), es decir, que en el sistema celular utilizado sólo se expresa un subtipo de receptor α_1 y que este subtipo de receptor sólo tiene un estado de afinidad para cada uno de los radioligandos utilizados.

El número de sitios de unión encontrados en el sistema de expresión del receptor α_1 está alrededor de 700 fmol/mg de proteína de membrana, valor muy alto, si se compara con el número de receptores adrenérgicos identificados en hepatocitos de cuyo (García-Sáinz et al., 1995a; García-Sáinz et al., 1993b), que está alrededor de 30 fmol/mg de proteína de membrana, por ello se considera que los hepatocitos de esta especie animal presentan una baja densidad de receptores adrenérgicos. Por otra parte, la sobre expresión del receptor clonado α_1 obtenida por el método de transfección parece no influir en las características farmacológicas conocidas de esta proteína.

Cuando los ensayos de saturación se realizaron en membranas preincubadas con cloroetilclonidina para probar el efecto de este agente sobre el receptor clonado, se observa una discreta caída en el valor del pegado máximo, si se comparan con el control (fig. 3 y 4). Esta caída es más evidente si observamos el análisis de Scatchard en pruebas con [³H]prazosina. En ellas hay un porcentaje de disminución del $33.6 \pm 10.58\%$ en comparación con las pruebas hechas con [³H]tamsulosina, en donde el porcentaje de caída es del $24.8 \pm 4.6\%$ (cuadro 1, figs. 3, y 4). Sin embargo debido a la varianza en los datos de los experimentos realizados, esta ligera sensibilidad al agente no es estadísticamente significativa. Como se ha reportado previamente, la cloroetilclonidina es un agente capaz de inactivar a los subtipos α_{1B} (Han., et al 1987; Minneman 1988) y α_{1D} (Pérez et al. 1991; Hieble et. al., 1995), y no así al subtipo α_{1A} que muestra poca sensibilidad a este agente (LeClerc et al., 1980). Con respecto a las diferencias de sensibilidad a la cloroetilclonidina que presentan los receptores α_{1A} recombinantes y los expresados en otras células se ha observado que tanto las variaciones experimentales como el fenotipo de la célula donde se expresan los receptores son factores que influyen en la sensibilidad al agente alquilante (Guarino et al., 1996). En este sentido Hieble y colaboradores (1995) mencionan que la sensibilidad de los receptores α_{1A} a este agente es especie-dependiente, hecho que se demuestra con experimentos de asociación de [³H]tamsulosina, en membranas de hepatocitos de cuyo en donde se encuentra un efecto muy pequeño, a diferencia de la gran inhibición observada en hepatocitos de conejo (García-Sáinz et al., 1995).

En cuanto a la afinidad del receptor por el ligando [^3H]prazosina en los ensayos de preincubación con cloroetilclonidina se puede observar un ligero aumento en el valor de la constante de disociación (K_d), por otro lado los valores obtenidos utilizando [^3H]tamsulosina no presentan cambio alguno en la afinidad de los receptores expuestos al agente alquilante (cuadro 1 y figs. 3 y 4). En ambos casos no existe una diferencia estadísticamente significativa, por lo que se puede sugerir que el receptor clonado es insensible a la inactivación por cloroetilclonidina, resultados consistentes con lo reportado para el subtipo de receptor α_1 presente en hígado de cuyo (García-Sáinz et al., 1992 a; García-Sáinz y Romero-Avila, 1993; García-Sáinz et al., 1995)

Debido a que se observó una alta afinidad del receptor hacia la [^3H]tamsulosina así como a su alto pegado específico, se decidió utilizar este radioligando para hacer experimentos de competencia con distintos agonistas y antagonistas, que presentan una alta afinidad para los receptores pertenecientes al tipo α_1 , y que han sido de gran utilidad para diferenciar a los receptores adrenérgicos α_1 en subtipos (cuadro 2, figs. 5 y 6). Los resultados que se obtuvieron de los experimentos de competencia muestran el siguiente orden de potencia para los agonistas: oximetazolina > epinefrina > norepinefrina > metoxamina; para los antagonistas se observa el siguiente orden de potencia: prazosina \geq 5 metil urapidil = benoxatán > fentolamina >> BMY 7378. Las curvas de los desplazamientos se ajustan perfectamente al modelo monofásico, lo que indica (en los agentes selectivos para los subtipos de receptores) que cada ligando se asocia a un subtipo de receptor con solamente un estado de afinidad específico, ya sea alto como para

el caso de prazosina, 5metilurapidil, benoxatián y fentolamina o relativamente bajo como sucedió con BMY 7378, en cuanto a los resultados observados para los antagonistas.

El orden de potencia que se determinó en los experimentos de competencia utilizando membranas de células transfectadas con el receptor clonado es similar al observado para los receptores de hepatocitos de cuyo (García Sainz et al. 1995). Al hacer una correlación con los valores de pK_i obtenidos de los desplazamientos con [3 H]tamsulosina y los datos del receptor adrenérgico α_{1A} de hepatocitos de cuyo reportados (García Sainz et al. 1995) se obtiene una recta con una pendiente de 0.79 y una $r^2 = 0.88$ (fig. 7) lo que indica claramente una similitud entre ambos perfiles farmacológicos.

Los parámetros funcionales del receptor α_{1A} clonado y expresado en células Cos-1 obtenidos cuando se estimula al receptor con epinefrina indican que es capaz de activar a la vía de transducción, ya que produce un incremento significativo en los niveles de fosfatos de inositol totales de $\approx 300\%$, consistente con lo observado para el receptor α_{1A} en hígado de cuyo (García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b). En el presente trabajo, se prueba también el efecto fisiológico del receptor ante su activación con epinefrina en presencia de prazosina, y se pudo observar que, como se esperaba, el efecto se abate casi totalmente (Figs. 8, 9 y 10)

En los experimentos realizados por García-Sáinz (García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b) también se observó que la activación de esta vía transduccional se da mediante una proteína G insensible a la toxina pertusis, y que

es un proceso parcialmente independiente de calcio extracelular. El efecto de ciertas hormonas en hepatocitos de cuyo sobre la transformación del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a inositol 1,4,5-trifosfato había sido también observado por Burgess et al. (1984; 1985). En mis experimentos, cuando el receptor α_{1a} expresado en células Cos-1 se estimuló con su agonista natural, la epinefrina, el incremento de IP_3 (inositol 1,4,5-trifosfato) que se observa es estadísticamente significativo (fig. 8 panel A). El IP_3 es un segundo mensajero que induce el incremento de Ca^{2+} celular al activar canales sensibles a IP_3 presentes en membrana de retículo endoplásmico (retículo sarcoplásmico en músculo) que permiten la salida de este ión.

En algunos tipos celulares se ha observado que este incremento no sólo se da por la salida del calcio de los reservorios intracelulares, sino que se puede inducir el influjo de calcio extracelular (Mineman 1988; Michel et al., 1990; Wilson et al., 1990a). En células no excitables este influjo se atribuye al IP_3 que actúa sobre proteínas tipo canal en la membrana plasmática, solo o en conjunción con mioinositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP_4), un metabolito del IP_3 (Exton, 1994). En el hígado, el incremento en los niveles de calcio influye entre otras cosas en la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Los niveles de calcio libre, en el citoplasma activan a la fosforilasa b cinasa, que a su vez fosforilará a la fosforilasa, la cuál romperá al glucógeno almacenado en la célula, liberándose así múltiples moléculas de glucosa (García-Sáinz 1998). En las células Cos-1 (sistema de transfección y expresión utilizado en los experimentos de esta tesis), se demostró previamente que los tres subtipos de receptores α_1 pueden movilizar el calcio

intracelular e incrementar el influjo de calcio, operados estos efectos vía canales de membrana plasmática (Pérez et al., 1993).

Con todos los datos obtenidos se puede concluir que el subtipo de adrenoreceptor clonado de hígado de cuyo es el α_{1a} . Con esto se ha terminado de definir con precisión el subtipo del receptor, que había causado cierta contradicción en investigaciones anteriores (García-Sáinz and Romero-Avila, 1993; García-Sáinz et al., 1992 a.b. 1995; González-Espinosa et al., 1999).

Al respecto, la selección de una metodología adecuada, fue la clave para poder obtener resultados confiables. En este sentido se observó la diferencia entre los radioligandos que se utilizaron en las saturaciones, donde los ensayos realizados con [3 H]tamsulosina presentaron menor pegado inespecífico que los realizados con [3 H]prazosina, por lo que se decidió utilizar al primero para realizar los desplazamientos. Anteriormente ya se había observado que este ligando es un antagonista muy potente de los receptores α_1 -adrenérgicos con una relativa selectividad por los α_{1A} sobre los α_{1B} (García-Sáinz, et al., 1995).

El tener al receptor α_{1a} de hígado de cuyo con una completa caracterización, así como contar con las condiciones de transfección y expresión, y las pruebas funcionales que lo respaldan nos permite dar un paso más en el conocimiento de la forma y función de una de las familias de receptores más importantes en la regulación de las catecolaminas en el hígado de vertebrados (Exton, 1980; Sulakhe et al., 1988).

Futuras investigaciones deberán enfocarse tanto a continuar con la caracterización de las familias y subtipos de receptores adrenérgicos en órganos de otros vertebrados, en estudiar diferencias funcionales, definir las líneas filogenéticas de estas moléculas y a responder por qué en el caso de la familia de los α_1 , tanto los α_{1A} como los α_{1B} pueden converger como sucede en el hígado de mono (García-Sáinz et al., 1996b).

Con respecto al α_1 , es necesario hacer más investigación para determinar en qué órganos se presenta este receptor, con qué densidad y a qué se debe su relativo bajo nivel de expresión en hepatocitos.

CONCLUSIONES

Utilizando a las células Cos-1 como sistema de expresión del receptor α_1 adrenérgico clonado de hepatocitos de cuyo. se realizaron diversos ensayos experimentales. Tanto los parámetros farmacológicos obtenidos mediante experimentos de asociación de ligando radioactivo, como los parámetros fisiológicos obtenidos mediante la medición del incremento en los niveles de fosfatos de inositol indican que:

- 1) La farmacología del receptor α_1 de hepatocitos de cuyo, clonado y expresado en células Cos-1 corresponde al subtipo α_{1a} adrenérgico.
- 2) El receptor α_{1a} expresado en células Cos-1 no presenta sensibilidad estadísticamente significativa al agente alquilante cloroetilclonida.
- 3) Se observa una alta correlación entre la farmacología del receptor α_{1A} de hígado de cuyo y la farmacología del receptor clonado α_{1a} .
- 4) La activación del receptor α_{1a} transfectado y expresado en células Cos-1 incrementa los niveles de fosfatos de inositol: IP_3 , IP_2 e IP_1 .

APENDICE: Propiedades de las interacciones ligando-receptor

Las interacciones de todos los receptores con sus ligandos naturales muestran ciertas propiedades:

Especificidad.

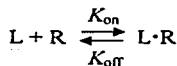
Alta afinidad.

Saturabilidad a altas concentraciones del ligando.

Respuesta fisiológica ante la activación de la señal durante la asociación ligando-receptor (Attie et al., 1995).

Constantes de binding

La constante de binding es análoga a la constante de equilibrio en una reacción química, por lo que el pegado de un ligando a un receptor se puede describir:



Al equilibrio, la relación de la concentración del complejo ligando-receptor $[L \cdot R]$ con el producto de las concentraciones de ligando libre $[L]$ y receptor libre $[R]$ es la constante de equilibrio o constante de asociación, K_a :

$$K_a = \frac{[L \cdot R]}{[L][R]}$$

En bioquímica la constante de disociación, K_d , es usada con mayor frecuencia y es un parámetro recíproco a la constante de asociación:

$$K_d = \frac{1}{K_a} = \frac{[L][R]}{[L \cdot R]}$$

La función de saturación es la fracción de receptores ocupados al equilibrio:

$$\frac{[L \cdot R]}{[R]_{total}} = \frac{[L]}{K_d + [L]}$$

Para obtener el pegado específico del ligando se debe de restar el pegado no específico al pegado total. Al graficar la concentración del ligando pegado contra el ligando libre se obtiene una figura curvilínea donde todos los sitios de binding están ocupados y estos no

umentan aunque la concentración del ligando aumente, este tipo de curvas nos da una impresión visual de su saturabilidad (fig.A. panel a)

La transformación lineal más usada para obtener los parámetros de binding (K_d y $[R]_{total}$) es la regresión de Scatchard

$$\frac{[L \cdot R]}{[L]} = \frac{1}{K_d} ([R]_{total} - [L \cdot R])$$

y si:

$$[L \cdot R] = \text{pegado} = B$$

$$[L] = \text{libre} = F$$

$$[R]_{total} = B_{max}$$



$$\frac{B}{F} = \frac{1}{K_d} (B_{max} - B)$$

Esta ecuación tiene la forma de la ecuación de una recta, por lo que si se grafican B/F contra B se obtiene una línea con una pendiente de $-1/K_d$, una B_{max} en donde la línea intersecta el eje de las "x" y una B_{max}/K_d en donde la línea intersecta el eje de las "y" (fig.A. panel b) (Attie et al., 1995).

Para medir los parámetros del Binding, se deben de tomar en cuenta los siguientes principios:

- El ligando marcado debe comportarse igual al estar sin la marca
- La medición de los parámetros debe hacerse al equilibrio ya que la K_d y la B_{max} son constantes termodinámicas
- La separación de $L \cdot R$ no debe afectar el equilibrio

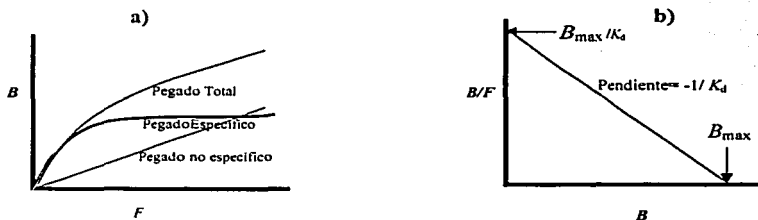


Fig. A. Panel a). Curva de saturación típica de una interacción ligando receptor. Panel b). Curva de Scatchard.

Competencia entre ligandos

Otro parámetro farmacológico que nos interesa es la K_i o constante de inhibición de un ligando. Para conocerla se realizan experimentos de competencia en los que un ligando está marcado radioactivamente y el otro no. El ligando marcado, comúnmente es el mejor caracterizado y del que se conoce el valor de la K_d . La concentración del radioligando libre se mantiene constante y cerca del valor de su K_d . Concentraciones variables del ligando no marcado se incuban de manera simultánea con el radioligando y con el receptor.

La ecuación que describe el pegado de dos ligandos al mismo sitio del receptor es:

$$f = 1 - \frac{B_{[I]}}{B_{[I]=0}} = \frac{[I]}{[I] + K_i \left[1 + \frac{F}{K_d} \right]}$$

Donde f es la inhibición fraccional del binding, e $[I]$ es la concentración del ligando no marcado libre. Hay que tomar nota de que el inhibidor competitivo de la unión del radioligando con el receptor (binding del receptor) no afecta la B_{max} (Attie et al., 1995).

BIBLIOGRAFIA

1. Alcántara Hernández R. (1997). "Expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-jun por la activación de receptores adrenérgicos". Tesis de maestría. UNAM.
2. Angers. S., Salahpour. A., Joly. E., Hilairat. S., Chelsky. D., Dennis. M., and Bouvier. M. (1999). Detection of β_2 -adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3684-3689.
3. Arinze. I. J. and Kawai. Y. (1983). Adrenergic Regulation of glycogenolysis in insolated guinea-pig hepatocytes: evidence that beta-2-receptor mediate catacholamine stimulation of glycogenolysis. *Arch. Biochem. Biphys.* **225**: 196-202.
4. Attie. A. D. y Raines. R. T. (1995). Analysis of receptor-Ligand Interacciones. *J. Chem. Educ.* **72**: 119-123.
5. Boyer. J. L., García. A., Posadas. C., and García-Sáinz. J.A. (1984). Diferential effects of pertusis toxine on the affinity state of agonist of renal α_1 adrenoceptors. *J. Biol. Chem.* **259**: 8076-8079.
6. Burgess G. M., Godfrey. P. P., McKinney. J. S., Berridge. M. J., Irvine. R., Putney. J. W. (1984). The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature* **309**: 63 - 66.
7. Burgess G. M., McKinney. J. S., Irvine. R., Putney. J. W. (1985). Inositol 1,4,5-triphosphate formation in Ca^{2+} -mobilizing-hormone-activated cells. *Biochem. J.* **232**: 237.
8. Bylund. D.B., Eikenberg. D.C., Hieble. J. P., Langer. S.Z., Lefkowitz. R. J., Minemman. K. P., Molinoff. P. B., Roffolo. R. R. Jr., and Trendelenburg. U. (1994). International Union of Pharmacology X. Recommendation for nomenclature of Adrenoceptors. *J. Pharmacol.* **46**: 121.

9. Cheng, Y. C. and W. H. Prusoff. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 3099-3105.
10. Coge, F., Guenin, S., Renouard-try, A., Rique, H., Ouvry, C., Fabry, N., Beauverger, P., Nicolas, J. P., Galizzi, J. P., Boutin, J.A., and Canet, E. (1999). Truncated isoforms inhibit [³H]prazosin binding and cellular trafficking of native human α_{1A} adrenoceptors. *Biochemical Society.* **343**: 231-239
11. Cotecchia, S., Erum, S., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. (1990 a). Regions of the α_1 adrenergic receptor included in coupling to phosphatidylinositol hydrolisis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 2896-2900.
12. Cotecchia, S., Kobilka, B. K., Daniel, K. W., Noland, R.D. and Lapetina, E. Y. (1990 b). Multiple second messenger pathways of α_1 - adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* **265**: 63-69.
13. Cotecchia, S., Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992). Discret aminoacid sequences of the α_1 adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolisis. *J. Biol. Chem.* **267**: 1633 - 1639.
14. Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randal, R. R., Lefkowitz, R. J., Carol, M.G. and Kobilka, B.K. (1998). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 - adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7159-7166.
15. Exton J. H. (1994). Phosphoinositide Phospholipases and G Proteins in Hormone Action. *Annu. Rev. Physiol.* **56**: 349-369.
16. Fain, J. N. and Garcia Sáinz, J. A. (1980). Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and of adenylate cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines. *Life Sci.* **26**: 118.

17. Fanjul. M.L., Hiriart. M., Fernandez de Miguel. F. 1998. *Biología Funcional de los animales*. México SXXI. 571 pp.
18. Feng. Y. H., Noda. K., Saad. Y., Liu. X. P., Husain. A. and Karik. S. S. (1995). The docking of Arg² of angiotensina II with Asp²⁸¹ of AT₁ Receptor is essential for full agonism. *J. Biol. Chem.* **270**: 12846-12850.
19. Forray. C., Bard. J.M., Wetzel. G., Chiu. E., Shapiro. R., Tang. H., Lepor. P. R., Harting. R. L., Weinshank. T. A., Branchek and Gluchowsky. C. (1994). The α_1 Adrenergic Receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has pharmacological properties of the clones human α_{1c} subtype. *Mol. Pharmacol.* **45**: 703.
20. Freund J. and Walpole R. 1980. *Mathematical statistics* third edition. Prentice Hall. New Jersey. 548 pp.
21. Gonzalez-Espinosa. C., Gonzalez-Ezpinosa. D., Romero-Avila. M. T., García-Sáinz. J. A. (1999). Inverse α_{1A} and α_{1D} adrenoceptor mRNA expression during isolation of hepatocytes. *Eu. J. Pharmacol.* **384**: 231-237.
22. García-Sáinz. J. A. and Romero-Avila. M. T. (1993c). Characterization of the α_{1A} -Adrenoceptors of Guinea Pig Liver Membranes: Studies Using 5-[3H] Methylurapidil. *Mol. Pharmacol.* **44**: 589-594.
23. García-Sáinz. J. A., (1993). α_1 - Adrenergic action: receptor subtypes, signal transduction and regulation. *Cell signal.* **5**: 539-547.
24. García-Sáinz. J. A., García-Caballero. A. and González-Espinosa. C. (1996). Characterization of the α_1 - Adrenoceptors of cat liver. Predominance of adrenergic subtype. *Life Sci.* **59**: 235-242.
25. García-Sáinz. J. A., Romero-Avila. M. T., Olivares-Reyes. J. A. And Macías-Silva. M (1992 a). Guinea pig hepatocyte α_{1A} -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **227**: 239-245.

26. García-Sáinz. J. A., Romero-Avila. M. T., Alcántara-Hernández. R., Olivares-Reyes. J.A. Macias-Silva. M. And Gonzales-Espinosa. C. (1992 b). Species Heterogeneity of Hepatic α_1 -Adrenoceptors: α_{1A} - α_{1B} and - α_{1C} - subtypes. Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**:760-767.
27. García-Sáinz. J. A., Romero-Avila. M. T., Villalobos-Molina. R. and Minemman. K. P. (1995d). α_1 -Adrenoceptor subtype selectivity of tamsulosin: studies using livers from different species. Eur. J. Pharmacol. **289**: 1-7.
28. García-Sáinz. J. A., Vázquez-Prado J. and Medina. L. Del C. (2000). α_1 - Adrenoceptors: function and phosphorylation. Eur. J. Pharmacol. **389**: 1-12.
29. García-Sáinz. J.A., Vázquez-Prado. J. And Villalobos-Molina. R. (1999b). α_1 - Adrenoceptors: subtypes, signaling and roles in health and disease. Arch. Med. Res. **30**: 449-458.
30. García-Sáinz. J. A. (1995). Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. Arch. Med. Res. **26**: 205-212.
31. Gonzalez-Espinosa. C., Romero-Avila. M. T., Mora-Rodríguez. D. M., Gonzalez-Ezpínosa. D., García-Sáinz. J. A. (2001). Molecular Cloning and functional expression of de guinea pig α_{1a} -adrenoceptor. Eur. J. Pharmacol. **426**: 147-155.
32. Goodman and Gilman's. 1996. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th Ed. McGraw Hill. San Francisco.
33. Gross. G., Hant. G., and Rugevics. C. (1988). 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the alpha 1 adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol. **151**: 333-335.
34. Han. C., Abel. P. and Minneman. K. P. (1987). Adrenoceptors subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. Nature. **329**: 33-335.

35. Hanft, G., Gross, G., Beckering, J. J., Korstajc, C. (1989). α_1 - adrenoceptors: the ability of various agonist and antagonist to discriminate between two distinct [3 H] prazosin binding sites. *J. Pharm. Pharmacol* **41**: 714-716.
36. Hieble, J. P., Bylund, D.B., Klarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minemman, K. P., and Roffolo, R.R. Jr. (1995). International Union of Pharmacol. X. Recommendation for nomenclature of α_1 - adrenoceptors consensus update. *Pharmacol. Red.* **47** : 267 - 270.
37. Hulme, E. C. 1990. Receptor-Effector Coupling. a Practical Approach. IRL Press. Oxford.
38. Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., Mccune, D. F., Olges, J. F., Hadley, Perez, D. M. And Piascik, M. T. (1999). Expression of multiple α_1 -Adrenoceptors on Vascular Smooth Muscle: Correlation with the Regulation of contraction. *J. of Pharmacol. and Exp. Ther.* **290**: 452-463.
39. Hurley, J. H. (1999). Structure, Mechanism, and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclase. *J. Biol. Chem.* **274**: 7599-7602.
40. Hwa, J., Graham, R. M. and Perez, D. M. (1995). Identification of critical determinants of α_1 adrenergic receptor subtype selective agonist-binding. *J. Biol. Chem.* **270**: 23189-23195.
41. Kawai, Y and Arinze, I. J. (1983). β -Adrenergic Receptors in Rabbit Liver Plasma Membranes PREDOMINANCE OF β -RECEPTORS AND MEDIATION OF ADRENERGIC REGULATION OF HEPATIC GLYCOGENOLYSIS. *Biol. Chem.* **258**: 4364-4371.
42. Keffel, S., Alexandrov, A., Goepel, M. and Michel, M. C. (2000). α_1 -Adrenoceptor Subtypes Differentially Couple to Growth Promotion and Inhibition in Chinese Hamster Ovary Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**: 906-911.

43. Kjelsberg, M. A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, and Lefkowitz, R. J. (1992). Constitutive activation of the α_{1B} -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol. Chem.* **267**: 1430-1433.
44. Kleuss, C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. M (1993) Selectivity in Signal Transduction Determined by γ Subunits of Heterotrimeric G Proteins. *Science*. **259**: 832-834
45. Kobilka, B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **15**: 87-114.
46. Laugwitz, K., Allgeier, A., Offermanns, S., Spicher, K., Sande, J., Dumont, J. and Schultz, G. (1996). The human thyrotropin receptor: A heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Cell Biol.* **93**: 116-120.
47. Le Clerc, G., Rouot, B., Schwatz, J., Velly, J. and Wermuth, C. G. (1980). Studies on some parasubstituted clonidine derivatives that exhibit an α_1 adrenoceptor stimulant activity. *Br. J. Pharmacol.* **71**: 5-13
48. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J., Caron, M.C. (1991). Molecular biology of α_1 -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochem. Biophys. Acta.* **1095**: 127-139.
49. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
50. Mabayoje Ayotunde Oriowo. (1998). Functional characterization of α_1 adrenoceptors subtypes in the rabbit spleen. *Arch Pharmacol.* **358**: 301-307.
51. Mackenzie, J. F., Daly, C. J., Pediani, J. D. And Mcgrath, J. C. (2000). Quantitative Imaging in Live Human Cells Reveals Intracellular α_1 -Adrenoceptor Ligand-Binding Sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**: 434-443.

52. Mante, S y Minneman, K. P. (1991) The⁴ alkylating prazosin analog SZL-49 inactivates both alpha 1 A- and alpha 1 B- adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **208** (2): 113-7
53. McCune, D.F... Edelmann, S. E., Olges, J. R., Post, G. R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J. and Perez, D. M. And Piascik, M. T. (2000). Regulation of the Cellular Localization and Signaling Properties of the α_{1B} and the α_{1D} Adrenoceptors by Agonists and Inverse Agonists. *Mol. Pharmacol.* **57**: 659-666.
54. Michel, M. C., and Insel, P. A. (1994). Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue α_1 -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **350**: 136-142.
55. Minneman K.P. 1988. α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources off cell Ca^{2+} *Pharmacol. Rev.* **40**: 87-119.
56. Minneman, K. P., Lee, D. Zhong, H., Bedrts, A., Abbott, K. L., and Murphy, T. J. (2000). Transcriptional Responses to Growth Factor and G Protein-Coupled Receptors in PC12 Cells: Comparison of α_1 -Adrenergic Receptors Subtypes. *J. Neurochem.* **74**: 2392-2400.
57. Nebigil, C. and Malik, K. V. (1992). Comparison of signal transduction mechanisms of alpha-2C and alpha 1 A adrenergic receptor-stimulated prostaglandin synthesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 987-996.
58. Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell.* **80**: 249-257
59. Pang, I-H, and Sternweis, P.C. (1990). Purification of unique α subunits of GTP binding regulatory proteins (G proteins) by affinity chromatography with immobilized $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* **265**: 18707-18712.

60. Perez, D. M., Piasick, M.T. and Graham, R.M. (1991). Solution-phase library screening for identification of rare clones: isolation of an α_{1D} and - adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* **40**: 876-889.
61. Piao, H., Taniguchi, T., Nakamura, S., Zhu, J., Suzuki, F., Mikami, D., Muramatsu, I. (2000). Cloning of rabbit α_{1B} -adrenoceptor and pharmacological comparison of α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} -adrenoceptors in rabbit. **396**: 9-17.
62. Quiagin (1998) *Plasmid Purification Handbook*. New Edition.
63. Romero Ávila M. T. "Caracterización del subtipo de receptor α_1 -adrenérgico presente en las membranas de hígado de humano y del mono Rhesus (*Macaca mulata*)". Tesis de maestría. UNAM.
64. Saussy, D.L., Goetz, A. Z., King, H. K. and True, T. A. (1994). BMY 7374 is a Selective antagonist of α_{1D} -adrenoceptors: evidence that rat vascular α_1 -AR are the α_{1D} subtype. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**: 32.
65. Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Franeau, R. T., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R.J., and Cotecchia, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a Novel α_1 -adrenergic subtype. *J. Bio. Chem.* **265**: 8183-8191.
66. Shinitzky. 1995. *Biomembranes Structural and Functional Aspects*. VCH. New York 383 pp.
67. Smith, Wood. 1996. *Cell Biology*. Chapman and Hall. London. 540 pp.
68. Tang, W. and Gilman, A. (1991). Type-Specific Regulation of Adenylyl Cyclase by G protein $\beta\gamma$ Subunits. *Science*. **254**: 1500-1503
69. Taylor, S.J. and Exton, J.H. (1991). Two α subunits of the Gq class of G proteins stimulate phosphoinositide phospholipase C $\beta 1$ activity. *FEBS Lett.* **286**: 214-216.

70. Tsujimoto G., Hirasawa, A., Sugawara, T. and Awai, T. (1998). Subtype specific differences in subcellular localization and chloroethylclonidine inactivation of α_1 adrenoceptors. *Life Sciences*. **62**: 1567-1571.
71. Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, E and Hashimoto, K. (1989). Glycogen Phosphorilase activation by two different α_1 -adrenergic receptor subtypes: metoxamina selectively stimulates a putative α_1 -adrenergic subtype (α_{1A}) that couples with Ca^{++} influx. *Mol. Pharmacol.* **36**: 166-176.
72. Villalobos-Molina, R., Hong, M. U. and Garcia-Sáinz, J. A. (1982). Correlation between phosphatidyl inositol labeling and contraction in rabbit α_1 -adrenergic activation. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **222**: 258-261.
73. Voet, D., Voet, J. G. 1990. *Biochemistry*. Wiley, New York 1223 pp.
74. Wang, C. D., Buck, M.A. and Fraser, C. M. (1991). Site-directed mutagenesis of alpha 2 A-adrenergic receptors: identification of aminoacids involveld in ligand binding and receptor activation by agonists. *Mol. Pharmacol.* **40**: 168-179.
75. Watson, S., Arkininstall, S. 1994. *The G-protein linked receptor facts book*. Academic Press, Great Britain.
76. Williams R.L. (1999). Mammalian, phosphoinositide-specific phospholipase C. *Bioch. Biophys. Acta.* **1441**: 255-267.
77. Wu, D., Katz, A., Lee, C. H., Simon, M. I. (1992). Activation of phospholipase C by α_1 - adrenergic receptors in mediated by the α subunits of a Gq family. *J. Biol. Chem.* **267**: 25798-25802.

78. Xiang, B., Yu, G. H., Chen, L., Hu, W., Pei, G., Ma, L. (2001). Heterologous Activation of Protein Kinase C Stimulates Phosphorylation of δ -Opioid Receptor at Serine 344, resulting in β -Arrestin- and Clathrin-mediated Receptor Internalization. *J. Biol. Chem.* 276: 4709-4716.
79. Zhong, H., Minneman, K. P. (1999) α 1-Adrenoceptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 375: 261-276.