

11281

lej  
5

MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL HORMONAL

TESIS  
que presenta el

M. en C. Rafael Villalobos Molina

para optar por el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS (BIOLOGIA MOLECULAR)

FACULTAD DE MEDICINA U. N. A. M. 1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

RESUMEN	2
I.- INTRODUCCION	4
II.- SUBTIPOS DE RECEPTORES: CATECOLAMINAS	5
III.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION	6
IV.- EFECTORES INTRACELULARES	11
IVa.- POLIFOSFOINOSITIDOS DE MEMBRANA Y EL EFECTO "PI"	11
IVb.- EL ION Ca COMO MENSAJERO INTRACELULAR	15
IVc.- RECEPTORES QUE MOVILIZAN Ca Y LA RESPUESTA BIOQUIMICA A LOS POLIFOSFOINOSITIDOS	17
V.- RESULTADOS QUE SUSTENTAN ESTA TESIS	28
VI.- DISCUSION GENERAL	32
VII.- PERSPECTIVAS	34
VIII.- REFERENCIAS	36

## RESUMEN

Se presentan 2 modelos que explican los mecanismos de transducción de la señal hormonal con base en la evidencia experimental, reproducible, que se ha reportado. Estos modelos describen la generación de los segundos mensajeros (AMP cíclico, a través de la actividad de Adenilato Ciclasa y (1,4,5)IP<sub>3</sub> y DAG a través del efecto PI) y la respuesta intracelular al estímulo hormonal.

Los resultados experimentales que sustentan esta tesis demuestran que el efecto PI es un mecanismo general para las hormonas que movilizan Calcio. Al estudiarse la acción de histamina sobre músculo liso vascular, se encontró que el efecto es mediado a través de receptores H-1 al emplear agonistas y antagonistas selectivos para los diferentes tipos receptores a Histamina.

En otra serie de experimentos se presentan resultados que sugieren la existencia de heterogeneidad entre los receptores Alfa-1 adrenérgicos al observarse efecto PI, como respuesta a varios agonistas, en músculo liso vascular pero carencia de efecto cuando se emplean hepatocitos como modelo. Otro hallazgo significativo para la proposición anterior es la inhibición del efecto de epinefrina cuando las células de hígado se someten a la acción de ésteres de forbol y la ausencia de efecto del forbol en músculo liso.

Los resultados se discuten en relación a la fosforilación de

los receptores Alfa-1 y los recientes criterios para la clasificación de los receptores.

## I.- INTRODUCCION

La comunicación intercelular en los organismos multicelulares se efectúa a través de la liberación de moléculas (neurotransmisores, hormonas y una gran variedad de factores reguladores y promotores del crecimiento) de células productoras, que interaccionan con proteínas receptoras específicas localizadas en la superficie celular de los tejidos blanco. Esta interacción agonista-receptor transduce la señal de la hormona (primer mensajero) a través de un complejo sistema de proteínas, generando una(s) molécula(s) (segundos mensajeros) encargadas de dar la señal intracelular que modifica la actividad de proteínas de membrana o intracelulares (canales iónicos, enzimas) en las células blanco, las cuales alteran su metabolismo a corto plazo: contracción, glucogenolisis, exocitosis, degranulación, fototransducción, etc.

Desde el descubrimiento del AMP cíclico como segundo mensajero se ha acumulado evidencia experimental que sugiere la existencia de una variedad de segundos mensajeros asociados a la estimulación hormonal.

En esta tesis se enfatizan los avances logrados en la elucidación de los mecanismos que regulan la generación de los segundos mensajeros derivados de los polifosfoinosítidos membranales, los receptores involucrados en la señalización y los efectos intracelulares producidos por estos mensajeros. El objetivo particular es demostrar la respuesta celular

(recambio de fosfatidilinositol) cuando el tejido se somete a la acción de hormonas que movilizan Ca.

Para entender el razonamiento del modelo que explica en gran medida los mecanismos de transducción de la señal hormonal, cabe hacer una reseña histórica de 3 hechos sobresalientes, a saber: a) la existencia de subtipos receptores hormonales (en especial para el caso de las catecolaminas); b) la existencia del "Efecto PI" que pone de manifiesto la importancia de los fosfolípidos que contienen inositol-P en la respuesta a la estimulación hormonal y c) el papel del ión Ca como mediador en la respuesta intracelular a las hormonas.

## II.- SUBTIPOS RECEPTORES: CATECOLAMINAS

En 1948, Ahlquist propuso la nomenclatura que define a 2 tipos receptores para las aminas adrenérgicas o catecolaminas: receptores Alfa y Beta adrenérgicos(1). Esta división se basa en las diferencias en sensibilidad de los receptores a varios agonistas y antagonistas adrenérgicos(1). Posteriormente, Lands et al(2) postularon la subdivisión de los receptores Beta adrenérgicos en Beta-1 y Beta-2 en función de la potencia relativa de una serie de aminas simpatomiméticas en los siguientes indicadores: movilización de ácidos grasos libres del tejido adiposo, estimulación cardíaca, broncodilatación y vasodilatación.

Los receptores Alfa adrenérgicos también han sido subdivididos en receptores Alfa-1 y Alfa-2 y se han

clasificado con base en sus características farmacológicas. En 1977, Berthelson y Pettinger (3) y en 1979, Wikberg (4) presentan evidencia experimental que apoya la clasificación utilizando fármacos que hasta ahora son los más útiles para discriminar entre ambos receptores. La prazosina es el antagonista más potente para los receptores Alfa-1, mientras que la yohimbina antagoniza preferencialmente a los receptores Alfa-2. A partir de este momento se han realizado estudios que demuestran la presencia de ambos receptores Alfa adrenérgicos en modelos in vivo (5), en tejidos aislados (6), en células aisladas (7) y en membranas aisladas (8).

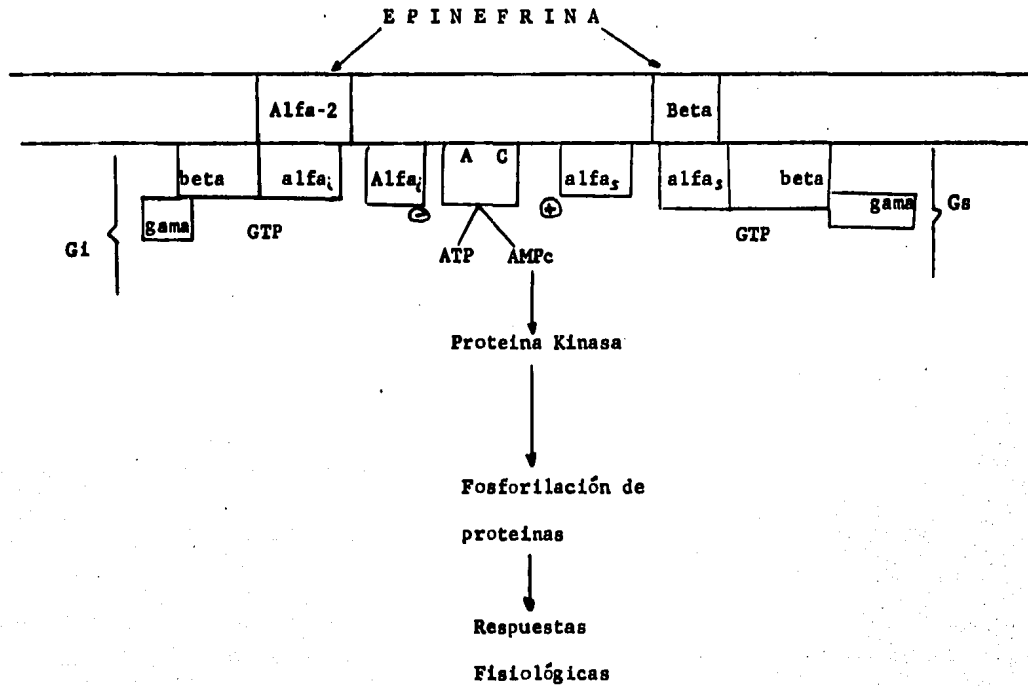
### III.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION

Es importante hacer notar que los receptores Beta-1 y Beta-2 adrenérgicos activan la Adenilato Ciclasa y estimulan la generación del segundo mensajero AMPc (9).

La transducción de la señal de los receptores Alfa-1 y Alfa-2 adrenérgicos puede efectuarse a través de una variedad de sistemas efectores, los cuales incluyen la inhibición de la Adenilato Ciclasa (Alfa-2), movilización de Ca (Alfa-1 y Alfa-2), hidrólisis de fosfatidilinositol (Alfa-1), aumento en el flujo de Na<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> (Alfa-1 y Alfa-2) y liberación de ácido araquidónico (Alfa-1 y Alfa-2) (10). Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad funcional, TODOS los receptores adrenérgicos actúan, aparentemente, vía interacción con una o más proteínas transductoras (proteínas G), las cuales acoplan



Figura 1.- La señal hormonal se transmite a través de un complejo sistema regulador el cual estimula (Gs) o inhibe (Gi) la actividad de Adenilato Ciclasa. El GTP activa Gs al disociar alfa-s de beta y gama. La GTPasa revierte este efecto. El GTP activa alfa-i al intercambiar GTP unido. La Adenilato Ciclasa cataliza la formación de AMPc a partir de ATP, (adaptado de referencia 11).



los receptores a sus mecanismos efectores respectivos (11).

Las proteínas G, en mamíferos, transducen las señales extracelulares en una diversidad de respuestas celulares (vide supra). Sin embargo, TODAS comparten un mecanismo común: una proteína que une GTP para realizar una función en 3 etapas, a saber: a) una vez estimulada por una proteína receptora (receptor membranal o detector de fotones), la proteína G libera GDP y une GTP; b) en esta conformación (G-GTP) la proteína G regula la función de un elemento efector, usualmente una enzima o canal iónico; c) la regulación del efector termina cuando la proteína G hidroliza el GTP unido para formar GDP y regresa a su estado basal inactivo (10) (fig.1).

En este momento se han definido, con más o menos precisión, las funciones y propiedades bioquímicas de 3 proteínas G:

G<sub>s</sub>, media la estimulación en la síntesis de AMPc a través de la Adenilato Ciclasa en respuesta a la estimulación de una variedad de receptores membranales para las aminas biogénicas (catecolaminas Beta adrenérgicas), péptidos (glucagon) y prostaglandinas.

G<sub>i</sub>, media la inhibición de la Adenilato Ciclasa a través de un conjunto de receptores diferentes para otros ligandos como aminas Alfa-2 adrenérgicas, somatostatina, adenosina y opioides (10).

Transducina-1, proteína G de las células retinales (bastones), estimula una fosfodiesterasa (PDE) para GMP cíclico en respuesta a la rodopsina fotoexcitada (12).

El mecanismo de acción de estas proteínas se ha elucidado con la ayuda de toxinas bacteriales; así, se tiene que Gs y Transducina-1 son sustratos para ADP ribosilación por la exotoxina de *Vibrio cholerae*. Es una modificación covalente que estabiliza la conformación G-GTP (activa) y aumenta la estimulación del efector. De manera similar, Gi y Transducina-1 son sustratos para ADP ribosilación por la toxina de *Bordetella pertussis*. Esta modificación covalente bloquea la unión entre las proteínas G y sus elementos detectores de la señal, reduciendo la transducción de la señal hormonal (10,11).

En adición a estas 3 proteínas G, se tiene evidencia bioquímica y resultados de experimentos con cDNA que sugieren la existencia de otras proteínas G. Así, se tiene que la visión del color por las células retinales (conos) parece estar mediada a través de una Transducina-2. Aunque ambas Transducinas estimulan la actividad de efectores similares (GMPC y PDE), los resultados indican que son proteínas estructuralmente diferentes.

Go, sustrato de la toxina pertussis, se encuentra en altas concentraciones en cerebro de mamífero aunque su función es desconocida. Por otro lado, los resultados de estudios usando GTP en la respuesta de los efectores sugieren la existencia de mas proteínas G; por ejemplo, una gran variedad de hormonas y otros ligandos estimulan la actividad de fosfolipasa C (PLC) dependiente de la concentración de GTP en las membranas de muchos tipos celulares en mamíferos, esta proteína Gx, estimula PLC que hidroliza fosfolípidos y genera inositol trisfosfato y diacilglicerol, los cuales movilizan Ca y

activan la proteína kinasa C, respectivamente (vide infra).

#### IV.- EFECTORES INTRACELULARES

##### IVa.- PÓLIFOSFOINOSITIDOS DE MEMBRANA Y EL "EFECTO PI"

En 1955, Hokin y Hokin demostraron un aumento en el recambio de fosfatidilinositol (PI) al estimular la secreción enzimática en rebanadas de páncreas con acetilcolina (13). El descubrimiento del efecto PI-PA (ácido fosfatídico) muestra la siguiente serie de hechos: a) el efecto ocurre con una variedad de agonistas y en una variedad de tipos celulares; b) el efecto es debido, principalmente, al recambio de PI-PA y no a la síntesis neta de los fosfolípidos, mientras que el 1,2 diacilglicerol (DAG) se conserva parcial o totalmente; c) la respuesta fisiológica (secreción de amilasa) no está asociada al recambio de PI, este proceso se evidenció posteriormente al omitir Ca en el sistema; d) el efecto PI se localiza en microsomas (fragmentos de membrana plasmática y de retículo endoplásmico) aislados después de la incubación de las rebanadas de páncreas. En los años 60's se demostró que el efecto es predominante en el retículo endoplásmico usando ganglios simpáticos y páncreas como modelos y radioautografía de (3H)inositol como indicador.

El primer modelo que explica la interacción entre el estímulo hormonal y el efecto sobre el ciclo PI-PA fue propuesto por

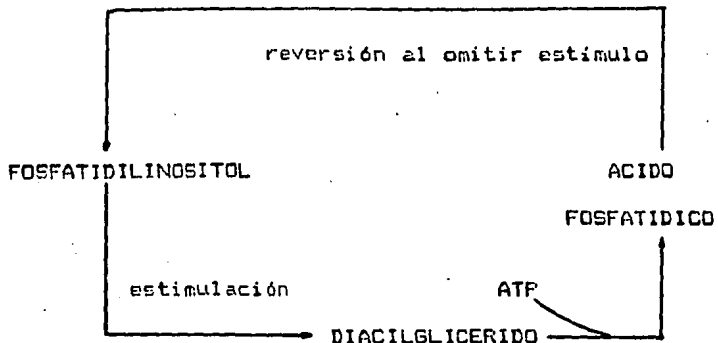


Figura 2.- Esquema del efecto PI-PA.

Eventos bioquímicos asociados con la estimulación de la secreción en la glándula de la sal por colina (adaptado de referencia 13).

los Hokin en 1964 (fig.2). Los puntos sustanciales de este modelo son: a) durante la estimulación colinérgica sobre rebanadas de glándulas de la sal en aves, la PLC cataliza la hidrólisis de PI en DAG y inositol-P (IP); b) la diacilglicerol kinasa sintetiza PA; c) al antagonizar el efecto con atropina, se recuperan los niveles basales de PI a expensas de PA bajo la acción secuencial de la PA citidiltransferasa, la PI sintetasa y mioinositol (referido en 14).

El modelo del ciclo PI-PA ha sido modificado en los últimos años al incorporar el papel de los polifosfoinosítidos (PPI) en la generación de los mensajeros intracelulares que median la respuesta a las señales extracelulares (fig.3, 15).

Los PPI constituyen el 2-8 % de los lípidos en las membranas celulares de las células eucariotes y son esenciales para la supervivencia celular. El grupo polar de estos lípidos es el mioinositol (fig.4); una proporción pequeña de estas moléculas contiene grupos fosfato en la posición 4 de mioinositol, fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) o en las posiciones 4 y 5, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI4,5P2).

Estos PPI son formados a partir de PI por kinasas y son degradados a PI por las correspondientes fosfatasas (fig.4). En la mayoría de las células los PPI representan 10-20 % de los lípidos de inositol. El PI4,5P2 se encuentra en menor cantidad que el PI4P, siendo su concentración 1-10 % del contenido de PI (16).

Los PPI se degradan rápidamente en respuesta a la unión de algunos agonistas específicos con sus receptores. Los 3 PPI

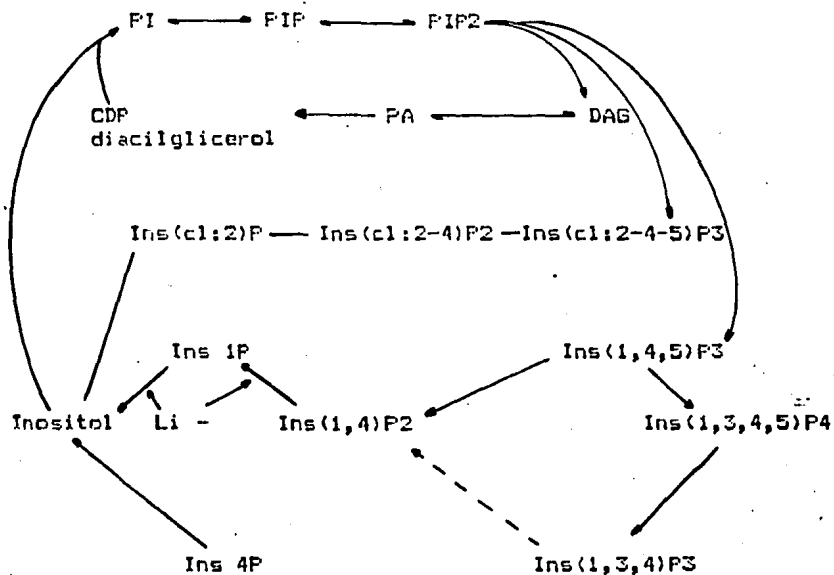


Figura 3- Esquema actual del ciclo de los polifosfoinosítidos

PA, ácido fosfatídico; Ins(c1:2)P, inositol 1,2 fosfato cíclico; Ins(c1:2-4)P2, inositol 1,2 ciclo,4 bisfosfato; Ins(c1:2-4-5)P3, inositol 1,2 ciclo,4,5 trisfosfato; Li, litio  
 PI, fosfatidilinositol; PIP, fosfatidilinositol-4-fosfato; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato.



son hidrolizados por una PLC que forma DAG y diferentes IP (fig.4). Los IP a su vez son degradados a mioinositol, el cual es utilizado para la resíntesis de PPI. EL DAG es hidrolizado por lipasas a monoacilglicerol y posteriormente a araquidonato y glicerol o es fosforilado por la diacilglicerol kinasa para formar PA.

La PLC es la enzima que genera las moléculas mensajeras derivadas de los PPI, se encuentra presente en la mayoría de los tipos celulares y se localiza principalmente en el citosol, aunque sus sustratos se encuentran en la bicapa membranal. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de una PLC unida a la membrana (16).

#### IVb.- EL ION Ca COMO MENSAJERO INTRACELULAR.

Desde su descubrimiento en 1808, se ha descrito que el ión Ca está involucrado en un número cada vez mayor de funciones celulares, incluidas: crecimiento y diferenciación, movilidad y contracción, endocitosis, exocitosis y secreción, y regulación del metabolismo intermedio (17). El ión Ca está considerado como otro de los segundos mensajeros que existen en la célula, él transduce los mensajes eléctricos y químicos que llegan a la membrana plasmática, provocando cambios en la maquinaria bioquímica de la célula que generan la respuesta fisiológica (18). Sin embargo, al ser un ión, es evidente que la concentración de Ca debe estar regulada por lo que las células han desarrollado un complejo sistema de proteínas que interaccionan con el Ca para mantenerlo dentro de estrechos

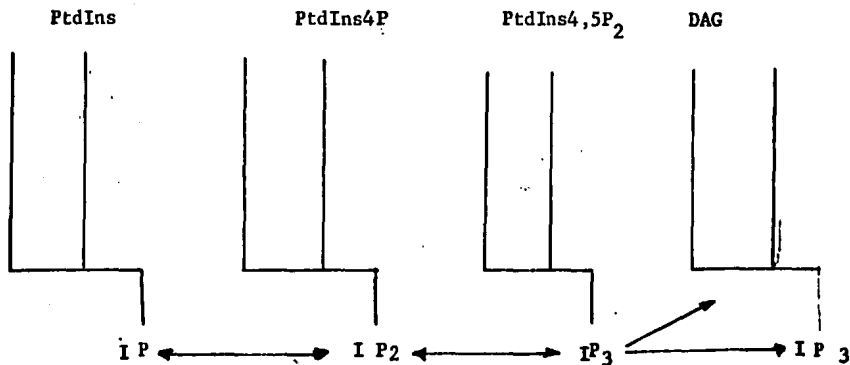


Figura 4.- Reacciones de fosforilación/defosforilación en el metabolismo de fosfoinosítidos.

Estos fosfoinosítidos están confinados, principalmente, en la parte interna de la membrana plasmática. Los agonistas actúan estimulando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), por una enzima fosfodiesterasa (PLC), para formar diacilglicerol (DAG) y inositol 1,4,5 trisfosfato (IP<sub>3</sub>). (adaptado de referencia 24).

límites de concentración. Estas proteínas pertenecen a 2 grupos :a) las que están incorporadas en las membranas celulares donde controlan el paso del Ca hacia el citoplasma o hacia el exterior o hacia los organelos; y b) las proteínas solubles en el citoplasma o en los organelos.

Las proteínas de membrana regulan la concentración de Ca eficientemente ya que son transportadoras y una molécula puede estar moviendo iones Ca, de un lado a otro de la membrana, indefinidamente. Además, se conocen diferentes sistemas que regulan la concentración de Ca a nivel de las membranas celulares (fig.5)

Las proteínas solubles están encargadas de mediar los efectos intracelulares. Dentro de este grupo se pueden mencionar a la calmodulina (activa la ATPasa membranar y la fosforilasa b kinasa); la troponina C (estimula contracción muscular); la fosfolipasa A-2 (degrada fosfolípidos de membrana) y la parvalbúmina (proteína de músculo esquelético de peces, anfibios y reptiles) de función incierta pero que se ha empleado para elucidar la interacción del Ca con las proteínas (18).

#### IVc.- RECEPTORES QUE MOVILIZAN Ca Y LA RESPUESTA BIOQUÍMICA A LOS POLIFOSFOINOSITIDOS.

Robert Michel (19) fue de los pioneros en sugerir que un recambio acelerado del PI es una de las respuestas de las células que reflejan la transducción de señales a través de la

membrana celular y está ligado con procesos que movilizan

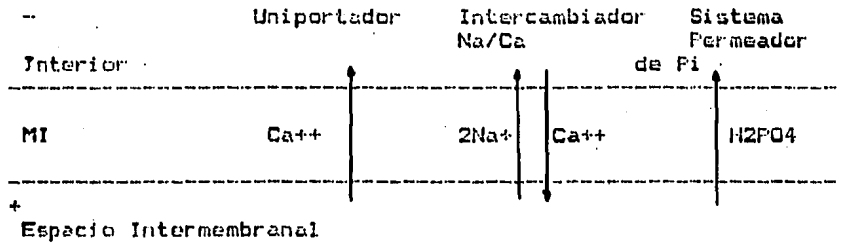
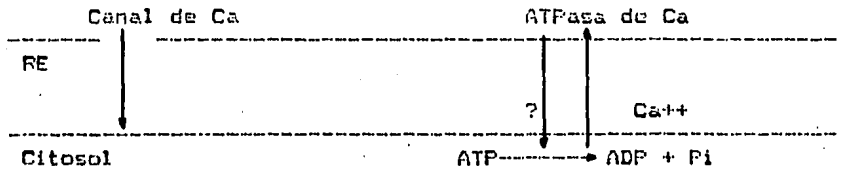
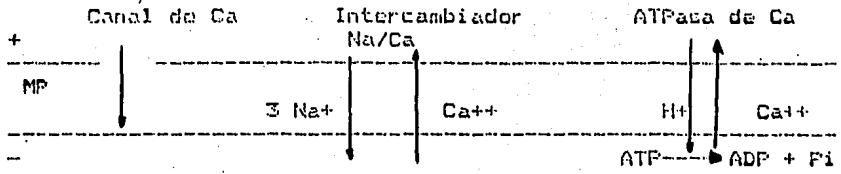
Figura 5.- Esquema de los sistemas transportadores de calcio. Los "canales" de Ca en la membrana plasmática (parte superior del esquema) se abren en respuesta a los cambios de voltaje, a través de la membrana; permitiendo la entrada de iones calcio y disminuyendo el gradiente de concentración que prevalece en ambos compartimentos.

El intercambiador Na/Ca exporta Ca de la célula, dependiendo en parte en el gradiente de Na y debido a que genera un imbalance eléctrico ( $3Na/Ca$ ), el intercambiador es potenciado por el gradiente de voltaje a través de la membrana. La ATPasa de Ca bombea calcio hacia el exterior utilizando la energía derivada de la hidrólisis del ATP en ADP y Pi.

La membrana del retículo sarcoplásmico (parte central del esquema), libera Ca al citosol a través de "canales" similares a los de la membrana plasmática, mediados por el gradiente de concentración. Existe una ATPasa de Ca que bombea el ión hacia el interior del retículo. Recientemente se ha descrito el papel del (1,4,5)IP<sub>3</sub> en la liberación de Ca por el retículo a través de un receptor (proteína G).

La salida de Ca a través de la membrana interna de la mitocondria (parte inferior del esquema) se efectúa por medio de un intercambiador Na/Ca, conducido por los gradientes opuestos de Na y Ca. La mitocondria acepta Ca por medio de un uniportador que permite la entrada de iones Ca positivos hacia el interior negativo del organelo. El tercer transportador acepta iones Pi que reaccionan con el Ca en la matriz mitocondrial para formar hidroxapatita y de esta manera, fijar

Ca. (adaptado de 18 y 25).



calcio. En experimentos recientes se ha podido determinar la concentración citoplásmica de Ca en células no estimuladas; esta concentración está en el rango 0.1-0.2  $\mu\text{M}$  (20-22), la cual es 4 órdenes de magnitud inferior a la concentración circulante (c.a. 1  $\text{mM}$ ). Al estimular a la célula, la concentración detectable de Ca varía entre 1-10  $\mu\text{M}$  (fig.6). La fuente de Ca durante este proceso es intracelular y/o extracelular. En los últimos años se ha acumulado evidencia experimental que indica que el retículo endoplásmico es la principal fuente de Ca que es liberado al citosol bajo un estímulo (23). Sin embargo, una alta concentración de Ca en el citoplasma es tóxica (17), por lo que el flujo de Ca es transitorio y los niveles "normales" se restablecen rápidamente cuando la célula utiliza varios mecanismos reguladores (fig.5).

Al utilizar otros enfoques, se ha podido demostrar que hay una estricta correlación entre la estimulación hormonal, la degradación de PPI y la movilización de Ca intracelular (Tablas I y II) (23); el mismo resultado se obtiene cuando se emplean células permeabilizadas sometidas a la acción hormonal o a la inyección de segundos mensajeros (Tabla III), o cuando se emplean microsomas expuestos a la acción de 1,4,5 IP<sub>3</sub> (24). Por otro lado, la presencia de DAG activa la proteína quinasa C a nivel de membrana plasmática y amplifica el efecto de 1,4,5 IP<sub>3</sub> (fig.7) (25).

Con base en una gran cantidad de datos experimentales se ha podido establecer un modelo que explica, con gran detalle, como se transmite la señal hormonal y los mensajeros que se



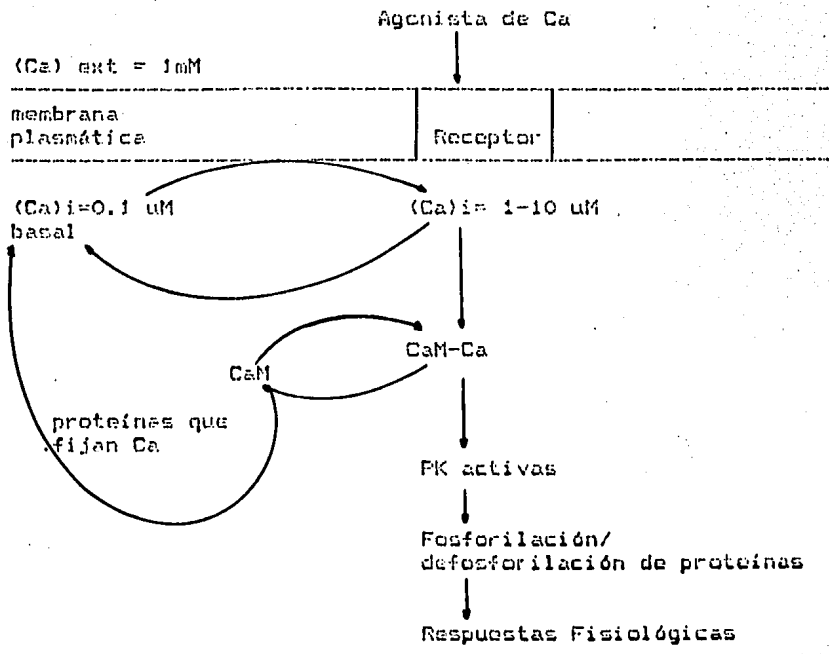


Figura 6.- Esquema que representa la regulación de los procesos fisiológicos dependientes de Ca en células animales.

En estado de reposo la concentración citoplásmica de Ca en la célula es de 0.1-0.2 uM y bajo estimulación aumenta a 1-10 uM y se une a calmodulina (CaM) u otras proteínas. El complejo CaM-Ca activa proteínas quinasas que a su vez modulan las actividades de algunas enzimas y procesos fisiológicos. Durante la relajación, el Ca interno disminuye a valores basales y esto conduce a la disociación del complejo CaM-Ca y subsecuentemente a la inactivación de las actividades enzimáticas y los procesos celulares (adaptado de 23).

TABLE I.- RECEPTORES ACOPLADOS AL RECAMBIO ESTIMULADO DE  
POLIFOSFOINOSITIDOS.

Estímulo (receptor)	Tejido blanco
Movilización de Ca	
ACh (muscarínico, M1 o M2)	músculo liso, cerebro, páncreas, parótidas
NE (Alfa-1 adrenérgico)	músculo liso, hepatocitos, adipocitos café
Histamina (H-1)	cerebro, células cromafines
Serotonina (5-HT2)	glándulas salivales mosca, cerebro, plaquetas
Peptidérgicos	
Vasopresina (V-1)	músculo liso, hepatocitos
Angiotensina II	" " "
Bradikinina	neuroblastoma-glioma NG 106-15
Sustancia P	músculo liso, parótida
F-metionil-leucil-fenilalanina	neutrófilos, leucocitos
Trombina	plaquetas
PAF	"
Otros	
Glucosa	islotes pancreáticos
Luz	fotorreceptores
Eléctrico (nicotínico)	músculo esquelético
ATP (purinérgico)	hepatocitos

Datos obtenidos de la referencia 23

TABLA II.- EFECTOS DEL INOSITOL (1,4,5)P<sub>3</sub> AL SER  
 INYECTADO EN CELULAS.

Tejido	Efecto
Limulus	fototransducción, movilización de Ca
Salamandra (bastones oculares)	modulación de la respuesta a la luz
Erizo de mar (ocitos)	membrana de fertilización
Xenopus (ocitos)	" "

Datos obtenidos de la referencia 24

**TABLA III. - EFECTO DEL INOSITOL (1,4,5)P<sub>3</sub> EN CELULAS  
 PERMEABILIZADAS.**

Tejido	Efecto	
páncreas	movilización de Calcio	
hígado	"	"
insulinoma	"	"
neutrófilos	"	"
pituitaria	"	"
macrófagos	"	"
paratiroides	"	"
plaquetas	"	"
músculo liso	"	"
músculo esquelético	"	"

Datos obtenidos de la referencia 25

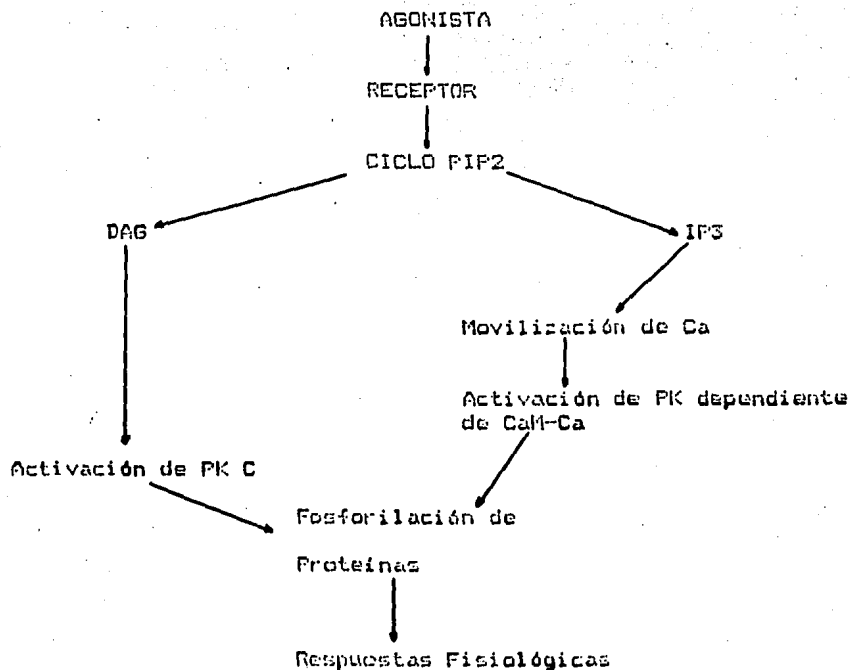


Figura 7.- Esquema que muestra la interacción sinérgica que ocurre entre las vías metabólicas que fosforilan proteínas al activar calmodulina (CaM) por un incremento en  $[Ca]_i$ , generado por el mecanismo de liberación de Ca a través de IP3, y la vía metabólica que fosforila proteínas por activación de proteína kinasa C (adaptado de 24 y 25).

forman, como estas moléculas alteran la homeostasis de Ca y la fosforilación de proteínas, eventos que modifican el metabolismo celular a corto plazo (fig.8).

#### V.- RESULTADOS QUE SUSTENTAN ESTA TESIS

La metodología y los reactivos empleados se encuentran descritos en cada una de las referencias.

##### Resumen de resultados referencia 26

Como se expuso en las secciones previas de esta tesis, existe una estricta correlación entre la activación de receptores asociados a la movilización de Ca y el recambio de PI. Como resultado de esta interacción se han descrito un número de efectos fisiológicos, incluida la contracción en músculo liso vascular (aorta), mediada por receptores Alfa-1 adrenérgicos (27), o vasopresina (28). Otro de los agonistas que estimula la contracción muscular es la histamina y su efecto es mediado al unirse a los receptores H-1 que alteran los niveles citoplásmicos de Ca (29).

EL COMPROBAR SI LOS RECEPTORES H-1, ADEMÁS DE MOVILIZAR Ca, ESTÁN ASOCIADOS AL RECAMBIO DE PI ES IMPORTANTE PARA APOYAR EL EFECTO PI COMO UN MECANISMO GENERAL DE SEÑALIZACIÓN PARA DIFERENTES HORMONAS.

Al exponer el músculo liso a la acción de la histamina aumenta la incorporación de  $^{32}P$  PI al PI dependiendo de la dosis, hasta alcanzar un máximo de efecto con una

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

concentración de histamina de 10  $\mu$ M (fig.1 26). El agonista

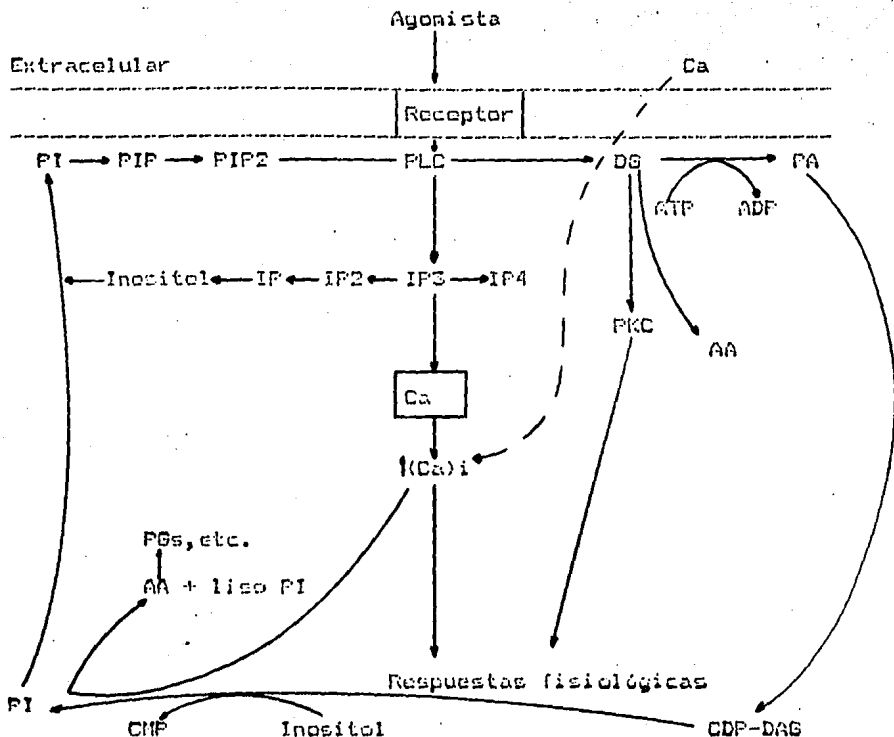


Figura 8.- Modelo que representa la generación de los segundos mensajeros involucrados en el efecto PI.

La degradación de PIP<sub>2</sub> favorece las reacciones que hay entre los receptores que mueven Ca y las respuestas celulares. Cabe destacar el papel de los diferentes inositol-P en la elevación de los niveles de (Ca)<sub>i</sub> a partir de fuentes intra y extracelulares.



2-(2 amino etil)tiazol, H-1; tiene el mismo efecto en el marcaje de PI, mientras que la impropidina (agonista H-2, activador de la Adenilato Ciclaza) no produce ningún cambio en el recambio de PI, aún a altas concentraciones. Por otro lado, el uso de antagonistas selectivos (H-1 o H-2) demuestra que la estimulación debida a histamina (a través del receptor H-1) es bloqueada por mepiramina y pirilamina en una respuesta dependiente de la dosis; mientras que la cimetidina (antagonista H-2) tiene un efecto parcial (inhibe 50 %) a una concentración de 100  $\mu$ M (fig.2,26).

#### Resumen de resultados referencia 30

Existe en la literatura evidencia experimental que sugiere la presencia de variedades de receptores dentro de los subtipos ya establecidos. El enfoque utilizado para demostrar esta heterogeneidad se basa en la respuesta de los diferentes tejidos a agentes farmacológicos que mimetizan en mayor o menor grado a los agonistas naturales.

DEMOSTRAR QUE EXISTEN VARIEDADES DE RECEPTORES ENTRE LOS SUBTIPOS IMPLICA QUE LA REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO ESTA SUJETA A MODULACIONES MUY FINAS QUE SE DEBEN TOMAR EN CUENTA PARA ENTENDER LAS FUNCIONES CELULARES. En esta sección presento resultados que apoyan la proposición anterior, empleando como modelos de estudio hepatocitos de rata y aorta de conejo.

Los resultados demuestran que tanto en hepatocitos como en aorta existe una correlación entre la presencia de los agonistas adrenérgicos clásicos (epinefrina, norepinefrina,

fenilefrina) y la estimulación en el marcaje de PI (fig.1,30); sin embargo, cuando los tejidos se someten a la acción de otros agonistas se observa que hay efecto total (en presencia de metoxamina) o parcial (en presencia de cirazolina o de oximetazolina) cuando el modelo empleado es aorta, mientras que no hay efecto de ninguno de los 3 agentes en hepatocitos (fig.1,30). Estos resultados sugieren la posibilidad siguiente: los agentes empleados pueden estar actuando a diferente nivel en hepatocitos. Sin embargo, al realizar el experimento siguiente: desplazamiento del efecto de epinefrina en el marcaje de PI en hepatocitos, se observa que los agonistas desplazan el efecto de epinefrina parcialmente (fig.2,30), con lo cual se demuestra que si hay una interacción entre el agonista y el receptor, pero no hay un recambio en el marcaje de PI (fig.1,30).

Adicionalmente, al determinar las afinidades relativas entre el receptor Alfa-1 adrenérgico y los agonistas (midiendo el desplazamiento de 3 H Prazosina o 125 I BE 2254 como indicador), se observa que no hay diferencia entre los valores obtenidos en hepatocitos o aorta (Tabla 1,30) apoyando los experimentos de marcaje de PI (fig.2,30). Otro hallazgo atractivo es el referente a la inhibición de los efectos de epinefrina mediada por ésteres de forbol (TPA) en hepatocitos y la carencia de efecto del TPA en músculo liso (fig.3,30).

#### VI.- DISCUSION GENERAL

Como ha sido descrito en esta tesis, la existencia de subtipos receptores membranales a hormonas y neurotransmisores

se ha demostrado con el empleo de agonistas y antagonistas mas o menos selectivos que permiten su caracterización farmacológica y bioquímica. Así, se tiene que los receptores Alfa-1 adrenérgicos, V-1 (vasopresina), 5HT2 (serotonina), H-1 (histamina) están asociados a la movilización de Ca intracelular y como consecuencia modifican la homeostasis celular: contracción del músculo liso; aunado a este aumento de Ca, y aparentemente como agente causal, hay un incremento en la degradación y resíntesis de fosfolípidos de membrana que contienen inositol-P. Sin embargo, en reportes recientes (31) se ha demostrado que la presencia continua de los agonistas desensibiliza a los receptores, esto es, se hacen "resistentes" a la presencia de los ligandos y como consecuencia hay una disminución en el efecto intracelular. A partir de estos resultados surge la pregunta ¿ como se mantiene el recambio de PI en nuestras condiciones experimentales?. La respuesta puede ser la siguiente: si hay secuestro de los complejos ligando-receptor y una disminución en su actividad, pero después de cierto tiempo se vuelven a exponer a la superficie celular y son nuevamente activados por el ligando, generando recambio de PI y siendo secuestrados a su vez. Dado que nuestros experimentos solo demuestran los resultados obtenidos a un tiempo de incubación (60 minutos), es difícil comprobar esta proposición. Por otro lado, el grupo de Lefkowitz (32,33) reporta que la estimulación prolongada de los receptores Alfa-1 adrenérgicos por norepinefrina, desensibiliza al receptor (disminuye el número de receptores en la membrana) y este fenómeno está asociado a un aumento en

la fosforilación del receptor. Al hacer el experimento con ésteres de forbol, demuestra que la proteína kinasa C está involucrada en la fosforilación (33). Sin embargo, en el modelo empleado (células de músculo liso en cultivo/purificación parcial del receptor y de la proteína kinasa C) no se estudia la posibilidad de una defosforilación de los receptores y su, probable, posterior estimulación.

Por otro lado, en trabajos recientes el grupo de García-Sáinz (34,35) reporta resultados que sugieren la existencia de heterogeneidad entre los subtipos receptores; esta proposición se encuentra mas o menos apoyada por el trabajo de otros grupos (36,37) donde se describe una diferencia en la respuesta a agonistas en músculo liso vascular y sistema nervioso, respectivamente, para el mismo subtipo receptor. Sin embargo, la evidencia experimental en algunos casos (angiotensina II) no es suficiente para proponer la existencia de variedades entre los receptores (35). Por otro lado, con el uso de radioligandos, anticuerpos monoclonales y la presencia o no de efectos intracelulares se está proponiendo una clasificación de los receptores mas precisa (37-39).

## VII.- PERSPECTIVAS

El modelo actual que explica la transducción de la señal hormonal (figs. 1,8) se ha elaborado en los últimos 5 años con base en una gran cantidad de reportes con datos experimentales obtenidos en diferentes tipos celulares por lo que se puede

aceptar como mecanismo general de la transducción hormonal. Sin embargo, en mi opinión dista mucho de ser la explicación final para este fenómeno; por el contrario, abre las puertas para una serie de preguntas importantes relacionadas con la regulación del modelo y su integración con el metabolismo celular.

En esta sección describo algunas de las preguntas a resolver en los próximos años:

1.- ¿Cómo se explica el que una gran cantidad de agonistas naturales actuen a través de unos cuantos mecanismos de transducción y segundos mensajeros?

2.- ¿Cuántos segundos mensajeros existen (IP3, DAG, IP4, IP5, IP6, AA, PA, etc.)

3.- ¿Cómo se regula la vida media de los receptores?

4.- ¿Cuál es la implicación in vivo de la desensibilización homóloga y heteróloga a las hormonas?

5.- ¿Cómo interaccionan diferentes hormonas en situaciones de stress para un mismo tejido blanco?

6.- ¿Cómo visualizar el modelo propuesto en tercera/cuarta dimensiones?

7.- ¿Cómo es la comunicación entre una célula que es estimulada y las que no lo son en el mismo tejido?

8.- ¿Cuál es el papel de los oncogenes en la regulación del modelo?

9.- ¿Cuál es la vida media del agonista una vez que se une al receptor?

10.- ¿Cuántos receptores tienen que ser estimulados/célula

para que se presente la respuesta celular?

Con el desarrollo de nuevas y más sofisticadas metodologías estas preguntas y muchas más serán resueltas en un futuro cercano.

#### VIII.- REFERENCIAS

- 1.- Ahlquist, R.P. (1948), *Am. J. Physiol.* 153:158
- 2.- Lands, A.M., A. Arnold, J.F. McNuliff, F.P. Luduena y T.C. Brown (1967), *Nature* 214:597
- 3.- Perihelsson, S. y W.A. Fettingner (1977), *Life Sci* 21:595
- 4.- Wikberg, J.E.S. (1979), *Acta Physiol. Scand* supp 468
- 5.- Drew, G.M. y S.B. Whiting (1979), *Br. J. Pharmacol.* 67:207
- 6.- Barker, K.A., B. Harper y I.E. Hughes (1977), *J. Pharm. Pharmacol.* 29:129
- 7.- Fain, J.N. y J.A. García-Sáinz (1980), *Life Sci.* 26:1183
- 8.- Wood, C.D., C.D. Arnett, W.R. Clarke, B.S. Tsai y R.J. Lefkowitz (1979), *Biochem. Pharmacol.* 28:1277
- 9.- Robinson, G.A., R.W. Butcher y E.W. Sutherland (1971) *Cyclic AMP*, Academic Press
- 10.- Bourne, H.R., S.E. Masters y K.A. Sullivan (1987), *Biochem. Soc. Trans.* 15:35
- 11.- Gilman, A.G. (1984) *Cell*, 36:577
- 12.- Kwok-Keung, F.E., y S.E. Navon (1987), *Biochem. Soc. Trans.* 15:39
- 13.- Hokin, L.E. y M.R. Hokin (1955), *Biochim. Biophys. Acta* 18:102
- 14.- Hokin, L.E. (1985), *Annu. Rev. Biochem.* 54:205
- 15.- Drummond, A.H., L.A. Joels y P.H. Hughes (1987), *Biochem. Soc. Trans.* 15:32
- 16.- Majerus, P.W., T.M. Connolly, H. Deckmyn, T. Ross, T.E. Bross H. Ishii, V.S. Bansal y D.B. Wilson (1986), *Science* 234:1519
- 17.- Orrenius, S. y G. Bellomo (1986), en *Calcium and Cell Function*, Vol. VI, Academic Press, pp 185
- 18.- Carafoli, E. y J.T. Penniston (1985), *Sci. Am.* 70
- 17.- Mitchell, R.H. (1975), *Biochim. Biophys. Acta* 415:81
- 20.- Exton, J.H. (1985), *Am. J. Physiol.* 248:E633
- 21.- Joseph, S.K. y J.R. Williamson (1983), *J. Biol. Chem.* 258:10425
- 22.- Williamson, J.R., R.H. Cooper, S.K. Joseph y A.P. Thomas (1985), *Am. J. Physiol.* 248:C203
- 23.- Abdel-Latif, A.A. (1986), *Pharmacol. Rev.* 38:227
- 24.- Berridge, M.J. (1986), *J. Exp. Biol.* 124:323
- 25.- Williamson, J.R. (1984), *Hypertension* 2(supp. II)11:140
- 26.- Willalobos-Molina, R. y J.A. García-Sáinz (1983) *Eur. J. Pharmacol.* 90:457

- 27.- Villalobos-Molina, R., M. Uc, E. Hong y J. A. García-Sáinz (1982), *J. Pharmacol. Expt. Ther.* 222:258
- 28.- Takhar, A. P. S. y C. J. Kirk (1981), *Biochem. J.* 194:167
- 29.- Schwartz, J. C., M. Garbarg y T. T. Quach (1981), *Trends. Pharmacol. Sci.* 2:122
- 30.- García-Sáinz, J. A., R. Villalobos-Molina, S. Corvera, J. Huerta-Bahena, G. Tsujimoto y B. B. Hoffman (1985) *Eur. J. Pharmacol.* 112:393
- 31.- Nishizata, N. T. K. Harden (1987), *Biochem. J.* 241:337
- 32.- Leeb-Lundberg, L. M. F., S. Cotecchia, A. DeBiasi, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1987) *J. Biol. Chem.* 262:3092
- 33.- Bouvier, M., L. M. F. Leeb-Lundberg, J. L. Benovic, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz (1987), *J. Biol. Chem.* 262:3106
- 34.- García-Sáinz, J. A. y S. M. T. Sotomayor-Hernández (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:6727
- 35.- García-Sáinz, J. A. (1987), *Trends. Pharmacol. Sci.* 8:48
- 36.- Ruffolo, R. R., Jr., J. E. Madoll y E. L. Yaden (1982), *J. Pharmacol. Expt. Ther.* 221:305
- 37.- Green, J. P. y S. Maayani (1987), en *Perspectives on Receptor Classification* (J. N. Black, D. H. Jenkinson y V. P. Gerokowitch, eds.) A. R. Liss, p. 237
- 38.- Thomas, H., I. C. Green, N. Wallis y R. Aston (1987), *Biochem. J.* 243:345
- 39.- Flavahan, N. A. y P. M. Vanhoutte (1986), *Trends. Pharmacol. Sci.* 7:347

Short communication

**H<sub>1</sub>-HISTAMINERGIC ACTIVATION STIMULATES PHOSPHATIDYLINOSITOL LABELING IN RABBIT AORTA**

RAFAEL VILLALOBOS-MOLINA<sup>a</sup> and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and <sup>b</sup> Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600 04510 México, D.F., México

Received 22 April 1983, accepted 28 April 1983

R. VILLALOBOS-MOLINA and J.A. GARCÍA-SÁINZ, *H<sub>1</sub>-histaminergic activation stimulates phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta*, European J. Pharmacol. 90 (1983) 457-459.

Histamine and 2-(2-aminoethyl)-thiazole induced dose-dependent increases in the labeling of phosphatidylinositol in rabbit aorta whereas imipromidine was without effect. The effect of histamine was inhibited by antihistamines with the following order of potency: mepyramine > pyrilamine > cimetidine. The data indicate that H<sub>1</sub>-histaminergic activation stimulates phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta and suggest the involvement of a calcium-signaling process in the action of H<sub>1</sub>-histaminergic receptors.

Histamine H<sub>1</sub>-agonists PI-labeling Aorta

**1. Introduction**

Activation of receptors whose actions involve calcium is usually associated with turnover of phosphatidylinositol (PI). The turnover of this phospholipid seems to be involved in the calcium-signaling mechanism although its role is still far from clear (Michell, 1975; Michell and Kirk, 1981).

In aorta, activation of V<sub>1</sub>-vasopressin receptors (Takhar and Kirk, 1981) or α<sub>1</sub>-adrenoceptors (Villalobos-Molina et al., 1982) stimulates phosphatidylinositol labeling with [<sup>32</sup>P]PI and produces contraction (Villalobos-Molina et al., 1982). It has also been shown that α<sub>1</sub>-adrenergic activation stimulates calcium fluxes in isolated aorta (Godfraind and Miller, 1982). In aorta, stimulation of H<sub>1</sub>-histaminergic receptors elicits smooth muscle contraction whereas activation of H<sub>2</sub>-histaminergic receptors relaxes smooth muscle (Holl and Mokler, 1982). H<sub>1</sub>-histaminergic receptors seem to be associated with the calcium-signaling mechanism whereas H<sub>2</sub>-histaminergic re-

ceptors seem to be coupled to adenylate cyclase in an activatory fashion (Schwartz et al., 1981). The purpose of the experiments was to test the possibility that histamine might stimulate phosphatidylinositol labeling and if so, to characterize the receptor involved.

**2. Materials and methods**

Histamine and pyrilamine were obtained from Sigma Chemical Co. Cimetidine, imipromidine, 2-(2-aminoethyl)-thiazole and mepyramine were generous gifts from Smith Kline and French. [<sup>32</sup>P]PI as orthophosphoric acid (carrier free) was obtained from New England Nuclear.

The detailed procedure to study phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta has been reported previously (Villalobos-Molina et al., 1982). In brief, rings of aorta were incubated at 37°C for 60 min in 1 ml of Krebs-Ringer tris buffer containing 10 μCi of [<sup>32</sup>P]PI. Lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1) and phospholipids separated by thin-layer chromatography. Incorporation of label into phospholipids was determined in silica gel scrapings.

<sup>b</sup> To whom all correspondence should be addressed.



### 3. Results

The basal incorporation of [ $^{32}$ P]Pi into the different phospholipids was similar to that reported previously (Villalobos-Molina et al., 1982). Incorporation into phosphatidylinositol was  $1548 \pm 94$  cpm/10 mg aorta wet weight (mean  $\pm$  S.E.M. of 7 determinations in duplicate).

The effect of histamine, 2-(2-aminoethyl) thiazole and impromidine on phosphatidylinositol labeling is presented in fig. 1. Histamine and 2-(2-aminoethyl) thiazole increased the labeling of phosphatidylinositol dose-dependently. Histamine was slightly more potent than 2-(2-aminoethyl) thiazole ( $EC_{50}$  for histamine =  $10^{-6}$  M and  $EC_{50}$  for 2-(2-aminoethyl) thiazole =  $3 \times 10^{-6}$  M). However, both agents were equally effective. Impromidine was without any effect on this parameter up to  $10^{-4}$  M.

The action of histamine ( $10^{-6}$  M) on phosphatidylinositol labeling was antagonized dose-dependently by mepyramine, pyrilamine and

cimetidine. Mepyramine was more potent than pyrilamine and much more potent than cimetidine. This latter agent only partially inhibited the effect of histamine at a concentration as high as  $10^{-4}$  M. The antihistamines themselves, i.e. in the absence of histamine were without effect on phosphatidylinositol labeling at the concentrations tested ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M).

### 4. Discussion

The availability of selective histaminergic agonists and antagonists allows the classification of effects as mediated through  $H_1$ - or  $H_2$ -histaminergic receptors. 2-(2-Aminoethyl)-thiazole (agonist), mepyramine and pyrilamine (antagonists) are selective agents for  $H_1$ -histaminergic receptors. Impromidine is an extremely potent and selective  $H_2$ -agonist whereas cimetidine is a classic  $H_2$ -antagonist (Schwartz et al., 1981). Therefore, based on the selectivity of the agents, our data

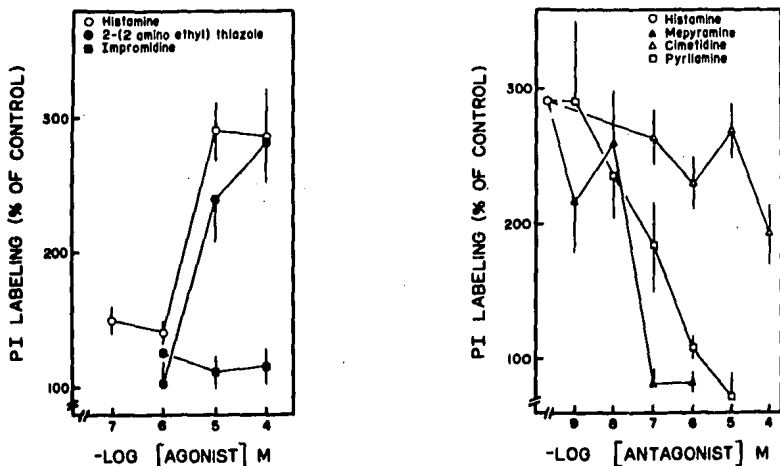


Fig. 1. Effect of histaminergic agonists and antagonists on phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta. *Left panel:* rings of aorta were incubated in the presence of different concentrations of histamine 2-(2-aminoethyl)-thiazole or impromidine. *Right panel:* rings of aorta were incubated with histamine  $10^{-5}$  M and different concentrations of mepyramine, cimetidine or pyrilamine. The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 determinations in duplicate.

clearly show that the PI effect induced by histamine is due to activation of  $H_1$ -histaminergic receptors. Furthermore, the relative potency of 2-(2-aminoethyl) thiazole, as compared to histamine, is very similar to that reported for other experimental models (Schwartz et al., 1981).

Agents that induce contraction in aorta, such as vasopressin (Takhar and Kirk, 1981), epinephrine (Villalobos-Molina et al., 1982), histamine (present work) and serotonin (in preparation) also stimulate phosphatidylinositol labeling. Although the role of phosphatidylinositol in the stimulus-contraction process is unknown, the data suggest that calcium is probably involved in the action of these agents (vasopressin, epinephrine, histamine and serotonin). Furthermore both effects (contraction and PI labeling) are associated to specific receptor subtypes ( $V_1$ ,  $\alpha_1$ ,  $H_1$  and  $5HT_2$  respectively) providing further support for the current idea that receptor subtypes may be associated to different mechanisms of signal transduction.

#### Acknowledgement

The authors want to express their gratitude to SKF for the generous donation of the selective agents used. They also thank

Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by a grant from CONACyT (ICCBNAL 800637).

#### References

- Godfraind, T. and R.C. Miller, 1982,  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor stimulation and Ca fluxes in isolated rat aorta, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 256, 171.
- Holl, J.E. and C.M. Mokler, 1982, Loss of  $H_2$ -histamine receptor activity in rabbit aorta after maturity, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4, 136.
- Michell, R.H., 1975, Inositol phospholipids and cell surface receptor function, *Biochim. Biophys. Acta* 415, 81.
- Michell, R.H. and C.J. Kirk, 1981, Why is phosphatidylinositol degraded in response to stimulation of certain receptors?, *Trends Pharmacol. Sci.* 2, 86.
- Schwartz, J.C., M. Garbag and T.T. Quach, 1981, Histamine receptors in brain as targets for tricyclic antidepressants, *Trends Pharmacol. Sci.* 2, 122.
- Takhar, A.P.S. and C.J. Kirk, 1981, Stimulation of inorganic-phosphate incorporation into phosphatidylinositol in rat thoracic aorta mediated through  $V_1$ -vasopressin receptors, *Biochem. J.* 194, 167.
- Villalobos-Molina, R., M. Uc., E. Hong and J.A. Garcia-Sáinz, 1982, Correlation between phosphatidylinositol labeling and contraction in rabbit aorta: Effect of  $\alpha_1$ -adrenergic activation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 258.

## DIFFERENTIAL EFFECTS OF ADRENERGIC AGONISTS AND PHORBOL ESTERS ON THE $\alpha_1$ -ADRENOCEPTORS OF HEPATOCYTES AND AORTA

J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ <sup>a,\*</sup>, RAFAEL VILLALOBOS-MOLINA <sup>a</sup>, SILVIA CORVERA <sup>a</sup>, JUDITH HUERTA-BAHENA <sup>a</sup>, GOZOH TSUJIMOTO <sup>b</sup> and BRIAN B. HOFFMAN <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, <sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510, México, D.F., and <sup>b</sup> Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford California 94305 and <sup>b</sup> V.A. Medical Center, Palo Alto, California 94304, U.S.A.

Received 11 December 1984, revised MS received 22 February 1985

J.A. GARCÍA-SÁINZ, R. VILLALOBOS-MOLINA, S. CORVERA, J. HUERTA-BAHENA, G. TSUJIMOTO and B.B. HOFFMAN, *Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of hepatocytes and aorta*, European J. Pharmacol. 112 (1985) 393-397.

Epinephrine, norepinephrine and phenylephrine stimulate phosphatidylinositol labeling with [<sup>32</sup>P]Pi in both rat hepatocytes and rabbit aorta. Methoxamine was a full agonist for this effect in rabbit aorta whereas cirazoline and oxymetazoline were partial agonists. In contrast, these three agents (methoxamine, cirazoline and oxymetazoline) were unable to stimulate phosphatidylinositol labeling in rat hepatocytes. Furthermore, cirazoline and oxymetazoline were able to displace the dose-response curve to epinephrine in rat hepatocytes, i.e., they behaved as antagonists. Binding competition curves of these agents with labeled adrenergic ligands indicate that the affinity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in these two tissues (aorta and liver) for the different agents tested was very similar. In addition it was observed that phorbol myristate-acetate inhibited in a dose-dependent fashion the epinephrine-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling in hepatocytes but was without effect on the action of the amine in aorta. Our data suggest that stereochemical differences for  $\alpha_1$ -adrenergic activation in liver and aorta may exist and indicate that the ability of phorbol esters to inhibit  $\alpha_1$ -adrenergic effects is not universal.

$\alpha_1$ -Adrenoceptors    Phorbol esters    Hepatocytes    Aorta

### 1. Introduction

$\alpha$ -Adrenergic receptors have been divided into two subtypes, i.e.  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ , on the basis of their affinity for agonist and antagonists and their mechanisms of signal transduction (Berthelsen and Pettinger, 1977; Fain and García-Sáinz, 1980). However, there are some data suggesting that differences might exist among adrenoceptors of the same subtype (Langer and Shepperson, 1982). The aim of the present work was to compare two model systems, rat hepatocytes and rabbit aorta, whose  $\alpha_1$ -adrenoceptors have been characterized

pharmacologically (Hoffman et al., 1980; Tolbert et al., 1980; Docherty et al., 1981; Hoffman et al., 1981). In both models  $\alpha_1$ -adrenergic activation produces marked increases in the labeling of phosphatidylinositol (Tolbert et al., 1980; Villalobos-Molina et al., 1982). The study of the same effect in tissues as different as the liver and the aorta allows a much simpler comparison of potencies and activities of adrenergic agents. We have recently described the ability of phorbol esters to inhibit  $\alpha_1$ -adrenergic effects in hepatocytes (Corvera and García-Sáinz, 1984). In the experiments described here the effect of the active phorbol ester, phorbol 12-myristate 13 acetate (TPA) on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling was compared in both tissues.

\* To whom all correspondence should be addressed.

## 2. Materials and methods

1-Epinephrine, 1-norepinephrine, 1-phenylephrine and phorbol 12-myristate 13-acetate were obtained from Sigma Chemical, Co. Methoxamine, oxymetazoline and cirazoline were generous gifts from Burroughs Wellcome, Merck and L.E.R. Synthelabo respectively. [ $^{32}$ P]Pi (carrier-free) and [ $^3$ H]prazosin were obtained from New England Nuclear. [ $^{125}$ I] was obtained as carrier-free Na[ $^{125}$ I] from Amersham. BE 2254 was a generous gift from Drs. Flasch and Armah (Beiersdorf Ltd., FRG).

The methodology for studying phosphatidylinositol labeling in both tissues has been described in detail elsewhere (Tolbert et al., 1980; Villalobos-Molina et al., 1982). In brief, isolated rat hepatocytes or rings of rabbit aorta were incubated for 60 min in medium containing 10  $\mu$ Ci/ml of [ $^{32}$ P]Pi. At the end of the incubation lipids were extracted and phospholipids separated by thin-layer chromatography (García-Sáinz and Fain, 1980).

Direct measurement of  $\alpha$ -adrenoceptors and determination of the potency of  $\alpha$ -adrenergic drugs for inhibiting the binding of selective radioactive ligands was performed as described previously (Hoffman et al., 1981; Tsujimoto et al., 1984). In brief, rat liver membranes were prepared by the method of Neville (1968) and assays for binding were done in a total volume of 1 ml at a concentration of  $\approx 1$  nM [ $^3$ H]prazosin. The incubation was for 30 min at 25°C by which time binding was at equilibrium. Incubations were terminated by a vacuum filtration procedure with a 20 ml wash with ice-cold buffer.

For the studies of  $\alpha_1$ -adrenoceptors of rabbit aorta a particulate fraction of the tissue was prepared by homogenization, centrifugation and resuspension with assay buffer (Tsujimoto et al., 1984). [ $^{125}$ I]BE 2254 was prepared by the method of Engel and Hoyer (1981). Assays for [ $^{125}$ I]BE 2254 (150-200 pM) were done in a total volume of 150  $\mu$ l at a protein concentration of 1-2.5 mg/ml; the incubation was for 15 min at 37°C. Incubations were terminated by vacuum filtration with a 20 ml wash with buffer at room temperature. The  $K_{DS}$  of competing drugs were calculated by the

method of Cheng and Prusoff (1973). The  $EC_{50}$  of each competitor was determined by a best fit of the four-parameter logistic equation (De Lean et al., 1978) using an HP-85 computer.

## 3. Results

As shown previously (Tolbert et al., 1980; Villalobos-Molina et al., 1982) epinephrine, norepinephrine and phenylephrine stimulated in a dose-dependent fashion the labeling of phosphatidylinositol in hepatocytes and aorta (fig. 1). Epi-

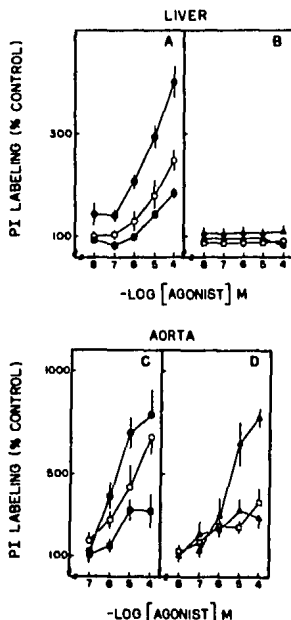


Fig. 1. Effect of adrenergic agonists on the labeling of phosphatidylinositol in liver cells and aorta. Liver cells (panels A and B) or rings of aorta (panels C and D) were incubated in the presence of different concentrations of epinephrine (filled circles, panels A and C), norepinephrine (open circles, panels A and C), phenylephrine (filled squares, panels A and C), methoxamine (open triangles, panels B and D), cirazoline (open squares, panels B and D) or oxymetazoline (filled triangles, panels B and D). The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 3-6 different preparations.

nephrine was more potent than norepinephrine in both tissues and phenylephrine was a partial agonist for the effect (fig. 1).

Interestingly, methoxamine was a potent full agonist in aorta whereas it did not stimulate phosphatidylinositol labeling in hepatocytes (fig. 1). Similarly, cirazoline and oxymetazoline produced clear stimulation of phosphatidylinositol labeling in aorta whereas no effect of these agents was detected in liver cells.

In order to determine if these agents (methoxamine, cirazoline and oxymetazoline) actually interacted with the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of liver cells, their potential effect on the action of epinephrine was tested (fig. 2). Methoxamine produced a very small shift to the right of the dose-response curve to epinephrine. On the contrary, cirazoline ( $K_i \approx 3 \times 10^{-6}$  M) and specially oxymetazoline ( $K_i \approx 10^{-7}$  M) clearly displaced to the right the dose-response curve to epinephrine in liver cells. The data indicate that these agents interact with the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of liver cells but are unable to activate them.

The  $K_D$ s for epinephrine, methoxamine and cirazoline were determined using radioligand binding techniques in membranes from rat liver and

TABLE 1

Affinity of  $\alpha_1$ -adrenoceptors of liver and aorta for adrenergic agonists.

(A) Rat liver ( $[^3H]$ prazosin)	$K_D$ ( $\mu$ M) *
Epinephrine	$2.3 \pm 0.9$
Methoxamine	$130 \pm 40$
Cirazoline	$1.0 \pm 0.5$
(B) Rabbit aorta ( $[^{125}I]$ BE 2254)	$K_D$ (M)
Epinephrine	$2.7 \pm 0.3$
Methoxamine	$83 \pm 17$
Cirazoline	$0.8 \pm 0.2$

\* Means  $\pm$  S.E.M.; n = 3.

rabbit aorta. No significant difference was observed in the affinities of these agents for the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of both tissues (table 1).

An additional difference between the two tissues was observed. In agreement with our previous findings (Corvera and Garcia-Sainz, 1984) it was observed that TPA inhibited in a dose-dependent fashion the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling in isolated hepatocytes (fig. 3). In contrast, the phorbol ester had no effect on the action of epinephrine on phosphatidylinositol labeling in aorta (fig. 3).

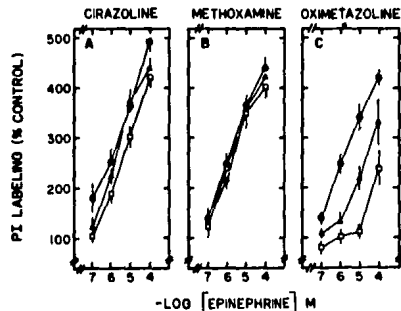


Fig. 2. Effect of cirazoline, methoxamine or oxymetazoline on the stimulation of phosphatidylinositol labeling induced by epinephrine in liver cells. Liver cells were incubated in the presence of different concentrations of epinephrine alone (filled circles), or with  $10^{-5}$  M (filled triangles) or  $10^{-4}$  M (open squares) of the following agents: cirazoline (panel A), methoxamine (panel B) or oxymetazoline (panel C). The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 6 determinations.

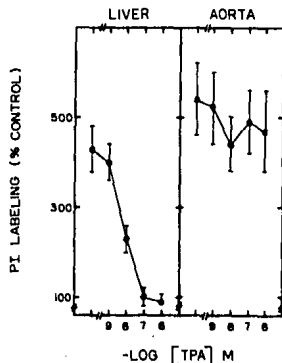


Fig. 3. Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) on the stimulation of phosphatidylinositol labeling due to  $\alpha_1$ -adrenergic activation. Liver cells or rings of aorta were incubated in the presence of  $10^{-5}$  M epinephrine alone (squares) or with different concentrations of TPA. The means were plotted and vertical lines represent the S.E.M. of 3-4 different preparations.

#### 4. Discussion

The affinity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors of rat hepatocytes and rabbit aorta for the selective  $\alpha$ -adrenergic agonists tested (epinephrine, methoxamine and cirazoline) was very similar. However, the ability of these agents to activate  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in these tissues was very different. It was surprising that cirazoline and oxymetazoline were partial agonists in aorta whereas they were devoid of any activity in rat hepatocytes; even more surprising was the absence of activity of methoxamine in rat hepatocytes. The data suggest that the stereochemical requirements for activation of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of liver and of aorta may be different.

Ruffolo and coworkers (1982) have observed a wide range of affinities for  $\alpha$ -adrenergic agonists and antagonists in mammalian aortas and suggested that the postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptors in these arteries are heterogeneous. These authors have also suggested that more than two types of  $\alpha$ -adrenergic receptors may exist in some species. However, it seems unlikely that the differences between species can explain our data, since it is known that methoxamine and oxymetazoline are effective  $\alpha_1$ -adrenergic agonists in rat aorta and that cirazoline is an effective  $\alpha_1$ -adrenergic agonist in the circulatory system of the rat (Van Meel et al., 1981; Boyer et al., 1983).

Our results indicate that  $\alpha_1$ -adrenoceptors of liver and aorta recognized the drugs employed with equal affinity. Whether the differences in efficacy relate to differences at the level of the receptor (stereochemical requirements for activation) or receptor-effector coupling is still unclear.

The effect of phorbol ester on  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated effects in hepatocytes seems to be due to activation of protein kinase-C (Corvera and Garcia-Sáinz, 1984). We have suggested that activation of protein kinase-C by phorbol esters might lead to receptor phosphorylation and decreased responsiveness (Corvera and Garcia-Sáinz, 1984). However, this has not yet been directly demonstrated. The absence of effect of phorbol esters on the  $\alpha_1$ -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling in rabbit aorta may be explained on the basis of at

least three possibilities: (a) the absence of protein kinase-C in rabbit aorta, putatively responsible for this effect of phorbol esters, (b) protein kinase-C could be activated by phorbol esters in this tissue but is located in a separate compartment of the cell without access to the plasma membrane and (c) that the  $\alpha_1$ -adrenoceptor of aorta could be a bad substrate for the kinase. Protein kinase-C seems to be widely distributed among organs and tissues. However, the protein kinase-C activity in aorta is specially low (Kuo et al., 1980).

The data nevertheless indicate that the effect of phorbol esters on  $\alpha_1$ -adrenergic actions is not universal and that the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of different tissues are subjected to different regulation.

#### Acknowledgements

B.B. Hoffman is supported by a PMA Faculty Development Award in Clinical Pharmacology and is a Hartford Foundation Fellow. G. Tsujimoto is a California Heart Association Fellow. This research was partially supported by Grants of the American Heart Association (82-1015) and CONACyT (PCCBBNA 020747). The authors thank Mrs. Guadalupe Ramlrez for skillfully typing the manuscript.

#### References

- Berthelsen, S. and W.A. Pettinger, 1977, A functional Basis for classification of  $\alpha$ -adrenergic receptors, *Life Sci.* 21, 595.
- Boyer, J.L., C. Cárdenas, C. Posadas and J.A. García-Sáinz, 1983, Pertussis toxin induces tachycardia and impairs the increase in blood pressure produced by  $\alpha_2$ -adrenergic agonists, *Life Sci.* 33, 2627.
- Cheng, Y.C. and W.H. Prusoff, 1973, Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099.
- Corvera, S. and J.A. García-Sáinz, 1984, Phorbol esters inhibit  $\alpha_1$ -adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128.
- De Lean, A., P.J. Munson and D. Rodbard, 1978, Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay radioligand assay and physiological dose-response curves, *Am. J. Physiol.* 235, E97.
- Docherty, J.R., J.N. Constantine and K. Starke, 1981, Smooth muscle of rabbit aorta contains  $\alpha_1$  but not  $\alpha_2$ -adrenoceptors, *Naunyn-Schmiede. Arch. Pharmacol.* 317, 5.
- Engel, G. and D. Hoyer, 1981, [ $^{125}$ I]BE 2254 A new high affinity radioligand for  $\alpha_1$ -adrenoceptors, *European J. Pharmacol.* 73, 221.

- Fain, J.N. and J.A. Garcia-Sáinz, 1980, Role of phosphatidylinositol turnover in  $\alpha_1$ - and of adenylate cyclase inhibition in  $\alpha_2$  effects of catecholamines, *Life Sci.* 26, 1183.
- Garcia-Sáinz, J.A. and J.N. Fain, 1980, Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells, *Biochem. J.* 186, 781.
- Hoffman, B.B., D.F. Dukes and R.J. Lefkowitz, 1981,  $\alpha$ -Adrenergic receptors in liver membranes: delineation with subtype selective radioligands, *Life Sci.* 28, 265.
- Hoffman, B.B., D. Mullikin-Kilpatrick and R.J. Lefkowitz, 1980, Heterogeneity of radioligand binding to  $\alpha$ -adrenergic receptors. Analysis of guanine nucleotide regulation of agonist binding in relation to receptor subtypes, *J. Biol. Chem.* 255, 4645.
- Kuo, J.F., R.G.G. Andersson, B.C. Wise, L. Mackerlova, I. Salomonsson, N.L. Brackett, N. Katoh, M. Shoji and R.W. Wrenn, 1980, Calcium-dependent protein kinase: Widespread occurrence in various tissues and phyla of the animal kingdom and comparison of effects of phospholipid, calmodulin, and trifluoperazine, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 7039.
- Langer, S.Z. and N.B. Shepperson, 1982, Recent developments in vascular smooth muscle pharmacology: the post-synaptic  $\alpha_2$ -adrenoceptor, *Trends Pharmacol. Sci.* 3, 440.
- Neville, D.M. Jr., 1968, Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540.
- Ruffolo, R.R. Jr., J.E. Waddell, E.L. Yaden, 1982, Heterogeneity of postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptors in mammalian aortas, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221, 309.
- Tolbert, M.E.M., A.C. White, K. Aspry, J. Cutts and J.N. Fain, 1980, Stimulation by vasopressin and  $\alpha$ -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells, *J. Biol. Chem.* 255, 1938.
- Tsujimoto, G., M.R. Bristow and B.B. Hoffman, 1984, Identification of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in rabbit aorta with [<sup>125</sup>I]BE 2254, *Life Sci.* 34, 639.
- Van Meel, J.C.A., A. De Jonge, P.B.M.W.M. Timmermans and P.A. Van Swieten, 1981, Selectivity of some  $\alpha$ -adrenoceptor agonists for the peripheral  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ -adrenoceptors in the normotensive rat, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 760.
- Villalobos-Molina, R., M. Uc, E. Hong and J.A. Garcia-Sáinz, 1982, Correlation between phosphatidylinositol labeling and contraction in rabbit aorta: Effect of  $\alpha_1$ -adrenergic activation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 258.