

27-37



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE LA ADENILATO CICLASA EN ADIPOCITOS DE HAMSTER Y DE RATA (RESPUESTA ALFA 2 ADRENERGICA)

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

OLGA MEDINA MARTINEZ

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

1989



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

	pag.
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION.	
a) Generalidades	3
b) Sistema de la Adenilato ciclasa.	5
c) Sistema de los fosfoinosítidos - calcio.	10
d) Receptores adrenérgicos.	13
3.- OBJETIVOS	17
4.- MATERIAL Y METODOS.	18
5.- RESULTADOS	21
a) Efecto de algunos agonistas alfa sobre la actividad de la adenilato ciclasa en adipocitos de hamsters.	
b) Efecto de algunos antagonistas alfa adrenérgicos sobre la inhibición por UK-14304 de la acumulación de AMPc en adipocitos de hamster.	
c) Efecto de algunos agonistas alfa adrenérgicos sobre la actividad de la adenilato ciclasa en adipocitos de rata.	
d) Efecto de algunos antagonistas alfa adrenérgicos sobre la inhibición por UK-14304 de la acumulación de AMPc en adipocitos de rata.	
e) Efecto de la toxina pertussis sobre la inhibición por UK-14304 de la acumulación de AMPc en adipocitos de hamster y	

de rata.

6. DISCUSION	25
7.- CONCLUSIONES	32
8.- BIBLIOGRAFIA	33

RESUMEN

Los receptores alfa 2 adrenérgicos son de particular importancia en las células grasas ya que modulan las acciones beta adrenérgicas de las catecolaminas. Los receptores alfa 2 adrenérgicos se han observado en adipocitos de muchas especies como hamsters, conejos, perros y humanos. Sin embargo la presencia de estos receptores en adipocitos de rata ha sido difícil de demostrar.

La finalidad del presente trabajo fue: caracterizar la habilidad de algunos agonistas alfa adrenérgicos para disminuir la acumulación de AMPc en adipocitos de hamster y reevaluar la presencia de receptores alfa 2 adrenérgicos en adipocitos de rata, utilizando UK-14304, una nueva herramienta farmacológica que tiene la ventaja de ser un agonista alfa 2 adrenérgico muy potente y altamente selectivo.

Se utilizaron ratas macho Wistar y hamsters dorados machos, alimentados ad libitum. Los adipocitos se aislaron del paquete de grasa del epidídimo por digestión con colagenasa, en una solución amortiguadora, suplementada con 3% de albúmina. Las células se incubaron durante 10 min. en presencia de diferentes agentes y 0.5 mM. de teofilina. La acumulación de AMPc se determinó por el método de Brown et al.. En algunos experimentos, se administró toxina pertussis a los animales 3 ó 4 días antes de realizar el experimento.

Los resultados indican que los agonistas con mayor eficacia para disminuir los niveles de AMPc tanto en adipocitos de hamster como en los de rata fueron el UK-14304, p-aminoclonidina y

clonidina. El efecto del UK-14304 fue bloqueado con el antagonista alfa 2 adrenérgico yohimbina y por la toxina pertussis. Esto demuestra la presencia en células grasas de rata, de receptores alfa 2 adrenérgicos acoplados a la enzima adenilato ciclasa a través de una proteína G.

Por otra parte, se completó la caracterización del receptor alfa 2 adrenérgico en adipocitos de hamster, observándose que el agente más eficaz para inhibir la acumulación de AMPc fue nuevamente el UK-14304.

INTRODUCCION

Todos los seres vivos tienen la capacidad de dar una respuesta coordinada a un estímulo dado. Esta capacidad es vital y requiere de sistemas coordinados de comunicación.

Sin duda, desde la aparición de los organismos más simples en nuestro planeta se fueron desarrollando sistemas de comunicación celular y, mediante la selección natural, se fueron conservando sólo aquellos que representaban ventajas adaptativas para las diferentes especies.

Aunque en los organismos más complejos los sistemas de comunicación también son más complejos, resulta claro que se conservan los elementos esenciales.

Uno de los sistemas de comunicación más poderoso y ampliamente difundido en la naturaleza es la comunicación química. Esta comunicación consiste en la liberación por una célula, de una sustancia que tiene la capacidad de alterar el funcionamiento de otras células receptoras al mensaje, llamadas células blanco.

Estas sustancias químicas pueden actuar sobre células relativamente cercanas constituyendo hormonas locales o autacoides; en algunos casos, su acción queda limitada a células cercanas, separadas solamente por el espacio sináptico, como en el caso de los neurotransmisores, o bien pueden ser producidas por una glándula de secreción interna y circular por el torrente sanguíneo como las hormonas (1).

En general, las hormonas regulan una gran variedad de actividades metabólicas y ejercen sus efectos sobre las células

blanco a través de receptores específicos. Estos receptores son proteínas capaces de reconocer e interactuar con el mensajero, además de transmitir el mensaje para que la célula produzca una respuesta (2).

Algunos receptores se encuentran presentes en el núcleo o en el citoplasma de la célula blanco, por lo que las hormonas, necesitan tener acceso al interior de la célula y unirse a estos receptores para formar el complejo hormona-receptor, el cual, con o sin alguna modificación, se transporta a sus sitios de acción. En general, estos receptores ejercen su acción en períodos de tiempo largos y están relacionados con funciones de crecimiento y diferenciación en tejidos específicos.

Por otra parte, existen receptores que se encuentran en la cara externa de la membrana plasmática, por lo que al formarse el complejo hormona-receptor, es necesario llevar el mensaje al interior de la célula porque es ahí donde ocurren los efectos. Por esta razón se desencadena todo un proceso de transducción del mensaje, que conduce a la formación de la señal intracelular, la cual es reconocida por aceptores que se encuentran en el interior de la célula, generalmente proteínas cinasas, las que provocan cambios en el funcionamiento celular, generalmente por procesos de fosforilación de algunos componentes de las células, como enzimas, canales, proteínas contráctiles, etc.

La comunicación celular, por lo tanto, involucra la secreción de un mensaje químico por una célula. Este mensaje interactúa con un receptor ubicado en la superficie de la célula blanco y al formarse el complejo hormona-receptor, éste interactúa con una serie de proteínas incluidas en la membrana

celular, las que transmiten información al inducir cambios conformacionales en la siguiente proteína del complejo, acción que culmina con la generación del segundo mensajero y la propagación intracelular de la señal para producir la respuesta.

Aunque muchas hormonas son capaces de regular una amplia variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos, el número de segundos mensajeros es sorprendentemente pequeño, es decir, la manera de internalizar la señal en la célula es marcadamente universal.

En la actualidad, se reconocen dos grandes mecanismos de transducción de la señal hormonal. Uno que utiliza el adenosín - 3,5 monofosfato cíclico (AMPC) como segundo mensajero, y otro que emplea una combinación de segundos mensajeros que incluyen iones de calcio y dos sustancias: el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DG) (3).

EL SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

El AMPC y la enzima que sintetiza esta molécula, la adenilato ciclasa, existen en casi todas las formas de vida. El papel universal del AMPC en la regulación de una enorme cantidad de eventos bioquímicos ha quedado bien establecido.

El reconocimiento de este sistema se inicia en 1958 cuando Earl Sutherland y Theodore W. Rall descubrieron el AMPC y observaron la modulación de sus niveles en respuesta a la acción hormonal.

Más tarde en 1971, Rodbell y sus colaboradores (4) demostraron que para la transducción de la señal se requería

guanosín trifosfato (GTP). El hallazgo original reveló que el GTP es esencial para la transducción de la señal, por lo que se propuso la existencia de una proteína "G" capaz de servir de acopladora entre los receptores y la enzima adenilato ciclasa.

La existencia de una proteína G específica fue claramente establecida cuando, por reconstitución de la proteína Gs se obtuvo actividad de la adenilato ciclasa, en membranas de células S49 cyc-, una línea mutante de células de linfoma de ratón, las cuales tienen el receptor y la unidad catalítica de la adenilato ciclasa, pero carecen de la proteína transductora G (5).

Estos experimentos de reconstitución fueron complementados por la identificación del sitio de unión del GTP utilizando tanto α (32P)GTP en estudios de marcado por fotoafinidad (6), así como toxina del cólera (7).

Sin embargo, aunque se conocían muchas hormonas capaces de estimular la actividad de la adenilato ciclasa, también se conocían otras que inhibían a la enzima y disminuían los niveles de AMPc.

El grupo de Rodbell (8) obtuvo algunas evidencias de que el GTP puede, en algunas células inhibir a la ciclasa, lo que sugería la presencia de otra proteína G acopladora en la acción inhibitoria.

La demostración de la existencia de dicha proteína G inhibitoria o Gi, en contraste con la Gs estimuladora, se logró utilizando toxina pertussis, que bloquea el efecto de esta proteína sobre la adenilato ciclasa (9).

De esta manera, se reconoció que el sistema de la adenilato ciclasa (Fig.1) consta de tres componentes: receptores, tanto

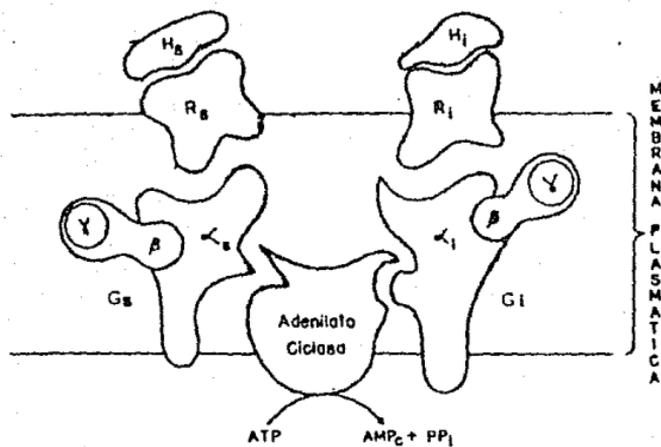


FIGURA 1. MODELO DE LA ADENILATO CICLASA. H_s , hormona estimulante; R_s , receptor activador; H_i , hormona inhibitoria; R_i , receptor inhibitor.

inhibitorios como estimulatorios, proteínas acopladoras Gs y Gi y la subunidad catalítica o adenilato ciclasa.

La existencia de dos tipos de receptores, tanto estimulatorios como inhibitorios del sistema de la adenilato ciclasa, ha sido confirmada por la clonación de sus genes (10). Estos receptores son proteínas frecuentemente glucosiladas que se encuentran embebidas en la membrana plasmática, presentando hacia el exterior el sitio de unión con el agonista.

Los receptores estimulatorios o Rs, promueven el incremento de AMPc al estimular a la adenilato ciclasa. Como ejemplo de estos receptores podemos mencionar a los beta adrenérgicos, a los de glucagon, a los de vasopresina, etc.

Los receptores inhibitorios o Ri, por el contrario, provocan la disminución de los niveles de AMPc al inhibir a la enzima; entre este tipo de receptores se encuentran los alfa 2 adrenérgicos, los de la acetilcolina, los de angiotensina II y los de los péptidos opioides.

Por otra parte, las proteínas G acopladoras, presentan varias propiedades en común: son capaces de unir iones magnesio y nucleótidos de guanina; son sustratos de la actividad (ADP ribosilación) de algunas toxinas bacterianas, como la toxina del cólera y la toxina pertussis y tienen función de GTPasas.

Las proteínas G están formadas por 3 subunidades: alfa, beta y gamma. La subunidad alfa tiene características variables entre las diferentes proteínas G, hasta hoy conocidas y su peso molecular varía entre los 30-60 KDa. La subunidad α presenta el sitio de unión de los nucleótidos de guanina y la función de

GTPasa. Las subunidades β y γ son muy similares en las proteínas G, con pesos moleculares de 35-36 kDa y de 5-8 kDa respectivamente.

El modelo cinético que se ha propuesto para explicar la interacción del complejo hormona-receptor con la adenilato ciclasa a través de las proteínas G (Fig. 2), fue desarrollado inicialmente por Pedersen y Ross (11), utilizando receptores adrenérgicos y proteínas Gs, purificados y reconstituidos en vesículas fosfolipídicas.

Las proteínas Gs en su estado basal o inactivo, se encuentran formadas por un trímero (las subunidades α , β y γ asociadas), unido a GDP y asociado al receptor, haciendo que este receptor se encuentre en estado de alta afinidad para el agonista (Ra), de tal manera que se encuentra formado el complejo Ra-Gs-GDP.

Cuando el agonista (H) se une a este complejo, se provoca la liberación del GDP y ese sitio es ocupado por GTP, entonces el agonista es liberado del complejo hormona-receptor para volver a estimular o ser degradado. Por otra parte el receptor se disocia, pasando a un estado de baja afinidad (Rb).

La proteína G se activa, disociándose sus subunidades y la subunidad α -GTP, es capaz de activar a la adenilato ciclasa; además esta subunidad hidroliza al GTP que lleva unido a GDP y fosfato inorgánico, quedando la forma α s-GDP; esta forma vuelve a asociarse con las subunidades $\beta\gamma$ para unirse al receptor en estado de baja afinidad, volviéndose a formar el complejo Rb-Gs-GDP y reiniciar el ciclo (1).

Parece ser que de una manera muy similar actúa la proteína

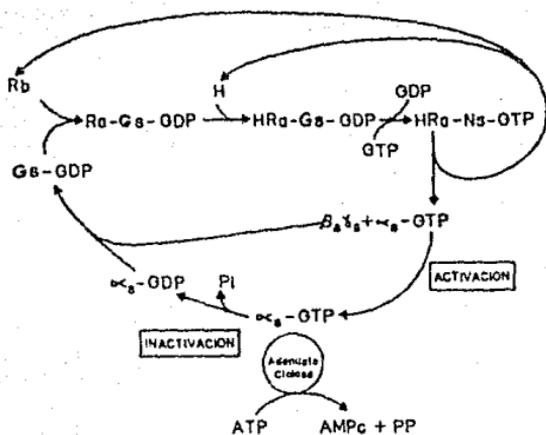


FIGURA 2. MODELO CINETICO PARA LA ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA. Ra, receptor en estado de alta afinidad; Rb, receptor en estado de baja afinidad; Gs, proteína acopladora; son las subunidades de Gs; H, hormona.

G_i , sólo que el complejo α 1-GTP inhibe a la adenilato ciclasa al interactuar con ésta (12). Sin embargo, se ha propuesto, que el complejo $\beta\gamma$ liberado cuando se activa la proteína G_i , puede asociarse con α s y así evitar la activación de la ciclasa (13).

Una vez que la adenilato ciclasa es activada, rompe el ATP para formar AMPc más pirofosfato; este segundo mensajero, el AMPc, activa específicamente a la proteína cinasa A.

La proteína cinasa A está formada por dos partes: una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Cuando el AMPc se une a la subunidad reguladora se libera la catalítica, la cual fosforila proteínas específicas, que se encargan de dar respuesta al mensaje. Aunque los niveles de AMPc aumentan rápidamente dentro de la célula por la acción hormonal, estos disminuyen por la acción de la enzima fosfodiesterasa, que cataliza el rompimiento de la molécula de AMPc (14).

En el estudio del sistema de la adenilato ciclasa, han sido importantes dos toxinas bacterianas: la toxina pertussis, que es producida por la Bordetella pertussis, el agente causal de la tosferina y la toxina que produce el Vibrio cholerae, el agente causal del cólera.

Ambas toxinas catalizan una modificación covalente de las proteínas G, utilizando NAD, transfiriéndoles la fracción ADP ribosa. La acción de ambas toxinas es sinérgica; la toxina del cólera ADP ribosila la subunidad α s, provocando la disociación del complejo $\beta\gamma$, lo que provoca que α s quede permanentemente unida a la adenilato ciclasa, activándola continuamente.

Por otra parte, la toxina pertussis ADP-ribosila a la subunidad α 1 induciendo la disociación del complejo $\beta\gamma$, sin embargo no ejerce su efecto inhibitorio persistente sobre la ciclasa, sino que, al parecer la acción de la toxina sobre α 1 la modifica de tal manera que no puede interaccionar con receptores que inhiben a la ciclasa; por lo tanto al no haber una restricción sobre la ciclasa, esta queda activada permanentemente (15).

Otro agente utilizado es la forskolina, que es un diterpeno aislado de las raíces de la planta Coleus forskohlii y que activa directamente a la adenilato ciclasa, pasando por alto al receptor y a la proteína G (46).

EL SISTEMA DE LOS FOSFOINOSITIDOS-CALCIO

Una gran variedad de células presentan receptores cuya activación altera el metabolismo de los lípidos de la membrana plasmática, con la producción de metabolitos intermedios que actúan como mensajeros intracelulares.

En 1953, Hoking y Hoking (16) observaron que algunas hormonas incrementaban el recambio de los fosfolípidos de la membrana, principalmente del fosfatidilinositol. Estas observaciones establecieron muchas características importantes para entender el metabolismo estimulado de este fosfolípido. Sin embargo, no aportaban evidencias suficientes para relacionar el fosfatidilinositol con la transducción de señales de la superficie celular a través de la membrana plasmática.

La idea de que los lípidos de inositol estaban implicados en

un nuevo mecanismo de transducción de señales, acoplado a receptores específicos, fue desarrollada entre 1969 y 1979 por Durell, Michell y cols.(17)

Se había observado que existían algunos receptores como el colinérgico muscarínico y los alfa 1 adrenérgicos, que al ser activados controlaban el metabolismo de los lípidos de inositol y al mismo tiempo, estos receptores causaban un incremento en la concentración de Ca^{++} en el interior de las células estimuladas. Sin embargo, el aumento de Ca^{++} intracelular no era el activador del metabolismo del fosfatidilinositol. Por otra parte, estos receptores, en general no activan a la adenilato ciclasa.

Estas observaciones y estudios posteriores, permitieron a Michell, Berridge y cols.(18), reconocer los pasos de este sistema de transducción (Fig. 3), el cual se inicia cuando los agonistas, al ocupar su receptor, activan a la enzima fosfolipasa C (FLC) que rompe a un fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol- 4,5- bifosfato (PIP₂), que se encuentra en muy bajas cantidades, aproximadamente el 1% del total de los lípidos de inositol.

Algunos estudios utilizando toxina pertussis, han dado evidencia de que la activación de la fosfolipasa C se encuentra regulada por una proteína G fijadora de nucleótidos (19), denominada G_p. Sin embargo, el pretratamiento con toxina pertussis en otros sistemas no ha tenido el mismo efecto, por lo que la presencia de dicha proteína G es aún una cuestión abierta.

La hidrólisis del fosfatidilinositol- 4,5- bifosfato produce mio-inositol-1,4,5 - trisfosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (DAG) quienes funcionan como segundos mensajeros intracelulares.

El inositol trisfosfato interactúa con receptores intracelulares, localizados en el retículo endoplásmico, logrando la apertura de un canal que libera calcio de este orgánulo (20), lo que provoca un aumento de 3-10 veces en la concentración de calcio citósolico. Este calcio es un factor de acoplamiento muy importante, porque activa un gran número de enzimas en forma directa y además a proteínas cinasas dependientes de calcio o del complejo calcio-calmodulina. Este aumento de calcio en el interior de la célula es rápidamente disminuido por la acción de las mitocondrias, que captan al catión y de una ATPasa de calcio que lo expulsa fuera de la célula.

El otro producto de la hidrólisis del PIP₂, el diacilglicerol, activa a una proteína cinasa C, que requiere Ca⁺⁺ y fosfolípidos, particularmente fosfatidilserina, para su activación. El diacilglicerol aumenta la afinidad de la proteína cinasa C por el Ca⁺⁺, pero bajo algunas condiciones fisiológicas su activación es independiente de la concentración de calcio, lo que nos indica que las acciones sinérgicas del Ca⁺⁺ y el diacilglicerol son las que activan a esta enzima (21). El diacilglicerol es una molécula hidrofóbica, que se produce principalmente en la membrana plasmática, donde puede ser metabolizada a ácido fosfatídico o ser degradada a glicerol y ácidos grasos, como el araquidónico, el cual a su vez puede generar otros mensajeros intracelulares, como las prostaglandinas.

Sin embargo, se ha sugerido que podrían existir otras moléculas además del diacilglicerol, que activan a la proteína

cinasa C, como el ácido araquidónico, otros eicosanoides y algunos glucolípidos, principalmente esfingolípidos (22).

La proteína cinasa C se encuentra en muchos tejidos y órganos, de los cuales se recupera en la fracción soluble en su forma inactiva, y aparentemente se transloca hacia la membrana cuando las células son estimuladas. Una vez estimulada, la proteína cinasa C participa en la propagación de la señal hormonal, por medio de fosforilaciones de proteínas específicas, implicadas en algunas respuestas fisiológicas.

Uno de los aspectos más importantes de este sistema, es la gran cantidad de fenómenos en los que se encuentra involucrado, tiene acciones inmediatas como la secreción de histamina, dopamina, insulina y muchas otras sustancias en diferentes tipos celulares, y acciones a más largo plazo, como la diferenciación y la proliferación celular (21).

RECEPTORES ADRENERGICOS.

Entre los agentes biológicos cuyas acciones se encuentran reguladas por receptores acoplados a la adenilato ciclasa o a la vía de los fosfoinosítidos- Ca^{++} , se encuentran las catecolaminas como la adrenalina y la noradrenalina.

Estas dos sustancias juegan un papel muy importante en el control de muchas funciones y respuestas del organismo a diferentes estímulos del medio ambiente. Estas sustancias actúan en las células de sus tejidos blanco a través de receptores localizados en la superficie de la membrana plasmática, llamados receptores adrenérgicos.

Así como para muchas otras hormonas, existen varios tipos de receptores adrenérgicos, los cuales han sido identificados basándose tanto en sus diferentes acciones fisiológicas como en su especificidad farmacológica (23).

Ahlquist (24) originalmente dividió a los receptores de las catecolaminas en dos grandes grupos, a los que llamó alfa y beta. Sin embargo, una serie de autores entre ellos B. Levy, Moran y Furchgott (25) habían notado una aparente heterogeneidad entre los receptores beta.

Lands y cols. basándose en sus investigaciones en donde comparaban las potencias relativas de una serie de agonistas beta, propusieron una subclasificación en receptores beta 1 y beta 2 (26). Ambos subtipos han sido purificados, caracterizados y secuenciados. (27)

Los dos subtipos de receptores beta, se pueden encontrar en un mismo tejido desempeñando diferentes funciones y pueden ser encontrados aún en la misma célula. Ambos subtipos de receptores beta se encuentran asociados a incrementos en los niveles de AMPc, por activación de la enzima adenilato ciclasa. En los receptores beta 1, tanto la epinefrina como la norepinefrina son equipotentes activadores, principalmente en el tejido adiposo y en el corazón, mientras que los receptores beta 2 son preferentemente activados por la epinefrina.

Por otra parte, los efectos alfa de las catecolaminas también se encuentran divididos en dos subtipos: alfa 1 y alfa 2, ya que presentan diferentes acciones bioquímicas y sorprendentemente, se encuentran acoplados a diferentes mecanismos de transducción de señales. La activación del receptor

alfa 1 adrenérgico, involucra el recambio de fosfolinosítidos y la elevación de calcio intracelular, mientras que el receptor alfa 2 inhibe a la enzima adenilato ciclasa por intermediación de una proteína G_i, además de que aparentemente estimula el intercambio Na⁺/H.⁽²³⁾

Existen una serie de evidencias que sugieren que las catecolaminas regulan el metabolismo de las células grasas. El efecto fisiológico más importante de estos agentes en el tejido adiposo, es la activación de la enzima triglicérido lipasa, que rompe moléculas de triglicéridos para generar ácidos grasos y glicerol, al mismo tiempo se activa la glucógeno fosforilasa y se inactiva la glucógeno sintetasa.

Los efectos de las acciones adrenérgicas sobre la lipólisis, parecen estar regulados por efectos opuestos entre los diferentes receptores adrenérgicos en las células grasas: estimulación a través de los receptores beta e inhibición por receptores alfa 2.

La estimulación mediada por los receptores beta 1, involucra la acumulación de AMPc, el cual activa a la proteína cinasa A, que fosforila a la enzima triglicérido lipasa, mientras que el receptor alfa 2 al inhibir a la adenilato ciclasa, y disminuir los niveles de AMPc, indirectamente inhibe a la enzima triglicérido lipasa.

Por otra parte, la activación de los receptores alfa 1 adrenérgicos, provoca la inhibición de la enzima glucógeno sintetasa y la estimulación de la glucógeno fosforilasa, pero en general, estos receptores presentan muy poco efecto sobre la

lipólisis. (28)

Los receptores alfa 2 adrenérgicos, son particularmente importantes en las células grasas, ya que ellos modulan las acciones beta adrenérgicas de las catecolaminas. En general los receptores alfa 2 adrenérgicos, son mas abundantes que los beta en estas células y los agonistas naturales como la epinefrina exhiben una mayor afinidad por estos sitios que por los receptores beta.

Los receptores alfa 2, han sido claramente caracterizados en los adipocitos de muchas especies, como hamsters (29), conejos (30), perros (31) e incluso en humanos (32)

En contraste, en los adipocitos de rata, que son los que se utilizan más comúnmente en el laboratorio, la presencia de receptores alfa 2 es controversial, ya que han sido encontrados en algunos estudios (33), mientras que otros sugieren que los adipocitos de rata carecen de receptores alfa 2 (29). Sin embargo, estas conclusiones se basaron en experimentos en donde se utilizaron agonistas alfa 2 poco selectivos, como la clonidina.

En un estudio reciente (34), en donde se utilizaba un agonista relativamente nuevo, el UK-14304 (5-bromo-6-(2 imidazolina 2-il-amino)quinoxalina), se observó una clara modulación de la lipólisis, a través de receptores alfa 2 en adipocitos de rata.

La presencia de receptores beta, alfa 1 y alfa 2, parece ser un patrón general en los adipocitos de todas las especies. El control dual que estos receptores ejercen sobre la lipólisis, otorga a las células grasas amplias posibilidades de adaptación a

sus diferentes necesidades fisiológicas (34).

OBJETIVOS

El presente trabajo sobre la inhibición de la actividad de la enzima adenilato ciclasa tiene como finalidad :

- Aportar datos que permitan ampliar el conocimiento sobre el receptor alfa 2 adrenérgico en adipocitos de hamsters, utilizando una serie de nuevos agonistas alfa adrenérgicos.
- Reevaluar la presencia de receptores alfa 2 adrenérgicos en adipocitos de rata, utilizando UK-14304, una nueva herramienta farmacológica que se caracteriza por ser un potente y altamente selectivo agonista alfa 2 adrenérgico.

MATERIAL Y METODOS

1) Sustancias utilizadas

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.: L-adrenalina, L-noradrenalina, oximetazolina, Adenosín 3-5 monofosfato cíclico (AMPC), dl-propanolol, 3,5- dimetil xantina (teofilina). La colagenasa y la albúmina sérica de bovino (fracción V) de Worthington y Armour respectivamente. La forskolina fue obtenida de Calbiochemical. El (3H) AMPC de New England Nuclear. Los siguientes agentes fueron generosamente donados por las compañías indicadas: UK-14304 y prazosina de Pfizer, SGD-10175 de Siegfried, metoxamina de Burroughs Wellcome, BHT-933, p-aminoclonidina y clonidina de Boehringer Ingelheim.

La toxina pertussis se purificó por el método de Sekura et. al. (35) a partir de un concentrado de vacuna.

2) Animales

Se utilizaron hamsters machos dorados de 180 a 200 g y ratas macho de la raza Wistar de 250-300 g, alimentadas ad libitum.

Algunos animales fueron inyectados con toxina pertussis (10 ug por cada 100g de peso) intraperitonealmente 3 días antes de ser sacrificados.

3) Aislamiento de adipocitos

Las células se aislaron por el método de Rodbell (36). Los animales se anestesiaron, obteniéndose el tejido del páncreo adiposo del epidídimo y del paquete perirrenal. El tejido se fragmenta y se incuba en una solución amortiguadora Krebs-Ringer-

Bicarbonato suplementado con albumina al 3% y 1 mg/ml de colagenasa, por un tiempo de 25-50 min. a una temperatura de 37°C en un baño de agitación constante.

Al término de la digestión las células se filtran a través de una malla de nylon. Después de lavarse se centrifugan a máxima velocidad durante 15 seg. en una centrífuga clínica, para lavarse en dos o tres ocasiones con la misma solución amortiguadora.

4) Incubación con las hormonas

La respuesta celular se valoró tomando como parámetro la acumulación de AMPc en células completas. Una vez aisladas las células se incubaron con las hormonas y los diferentes agentes durante 10 min.

5) Cuantificación de la acumulación de AMPc

Los adipocitos se incubaron a 37° C con las hormonas y los diferentes agentes durante 10 min, en presencia de teofilina (3, 5- dimetilxantina)

La cantidad de AMPc se determinó por el método de Gilman (37) modificado por Brown, et al.(38) que se basa en la competencia por el sitio de unión, entre el AMPc no marcado y el AMPc marcado con tritio, a una proteína dependiente de AMPc. El AMPc no pegado se separa del medio con carbón activado y luego se cortó la radiactividad en un contador de centelleo líquido. La cantidad de AMPc acumulado se estimó comparando los valores obtenidos con una curva patrón.

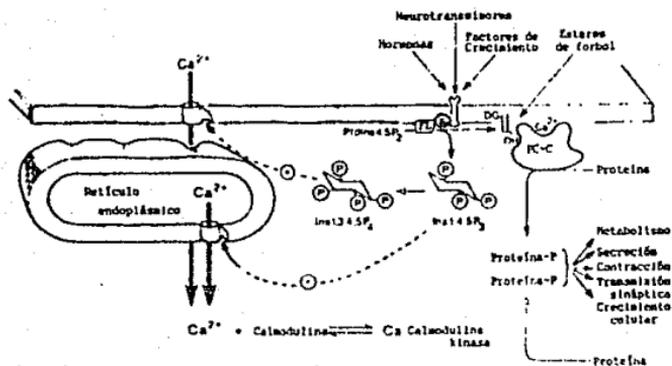


FIGURA 3. MODELO DE ACCION DE LOS RECEPTORES ACOPLADOS AL SISTEMA FOSFOINOSITIDOS - CALCIO. G, proteína acopladora; FL, fosfolipasa C; DG diacilglicérido; Ptdins 4,5 P₂, Fos fatidilinositol 4,5 bifosfato.

5) Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como la media \pm error estándar de determinaciones por triplicado de 5-6 experimentos, empleando diferentes preparaciones en cada caso.

RESULTADOS

Se estudió la potencia relativa de varios agonistas alfa adrenérgicos, comparando su capacidad para inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina en adipocitos de hamster.

En la Fig. 4 podemos observar que el agonista selectivo alfa 1, SGD-10175, fue el agente que tuvo menos capacidad de inhibir la acumulación de AMPc, mientras que la metoxamina, otro agonista selectivo de la respuesta alfa 1, sólo presenta un pequeño efecto inhibitorio a muy altas concentraciones.

Con agonistas alfa no selectivos (es decir, aquéllos que interactúan con ambos receptores alfa) se logró un efecto parcial de la respuesta inhibitoria. Con el BHT se logró una respuesta de sólo el 30% a una concentración 10^{-7} M, mientras que la oximetazolina logra una inhibición del 50% a una concentración 10^{-6} M.

Los agonistas naturales, epinefrina y norepinefrina, con su componente beta bloqueado con el antagonista propranolol 10^{-5} M, también inducen inhibición de la acumulación de AMPc de una manera dependiente de la concentración.

Ambos agentes muestran una eficacia aparente muy similar. El efecto de ambos agentes se logra desde muy bajas concentraciones, siendo la epinefrina ligeramente más potente que la norepinefrina.

El efecto inhibitorio de estos agentes se encuentra en un rango de concentraciones que va desde 10^{-12} M hasta 10^{-7} M. Sin

HAMSTER

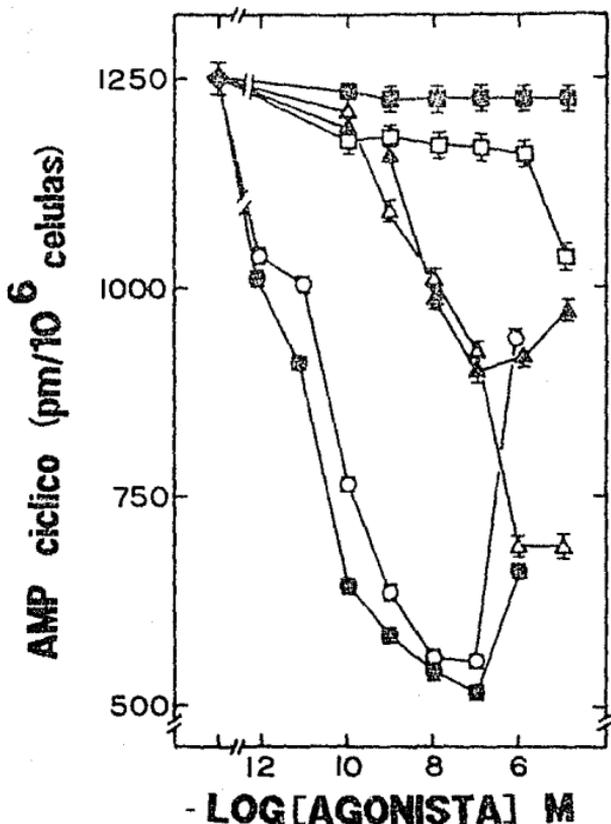


FIG. 4 EFECTO DE DIFERENTES AGONISTAS ALFA ADRENERGICOS SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR FORSKOLINA EN ADIPOSITOS DE HAMSTER. Los adipocitos fueron incubados en la presencia de 10µM de forskolina sola (♦) o con diferentes concentraciones de los sig. agonistas : SGD-10175 (■); metoxamina (□); noradrenalina + 10 µM de propranolol (○); adrenalina + 10µM de propranolol (●); BHT-933 (▲) y oximetazolina (△). Valor basal de AMPc 99±1.

embargo, el efecto se revierte de manera importante a una concentración $10^{-6}M$.

Los datos más interesantes fueron obtenidos con tres agentes selectivos de la respuesta alfa 2 adrenérgica, pertenecientes al grupo de las imidazolininas (Fig. 5). Estos 3 agentes, clonidina, p-aminoclonidina y UK-14304, inhiben la acumulación de AMPc, inducida por forskolina, de una manera dependiente de la concentración. El agente más eficaz para inhibir esta respuesta fue el UK-14304 y el menos eficaz la clonidina. El orden de potencia para estos tres agentes fue: p-aminoclonidina > clonidina > UK-14304, mientras que el orden de eficacia fue: UK-14304 > p-aminoclonidina > clonidina.

En la Fig.6 se observa que el efecto inhibitorio del UK-14304 no se bloquea con el antagonista alfa 1 adrenérgico, prazosina, sin embargo, cuando se utiliza el antagonista alfa 2 adrenérgico yohimbina, el efecto inhibitorio del UK-14304 se bloquea de una manera dependiente de la concentración.

Cuando estudiamos el efecto de estos tres agentes imidazolínicos en adipocitos de rata, se observó que ninguno de estos produjo una inhibición clara sobre la acumulación de AMPc estimulada por forskolina. Sin embargo, cuando se utilizan cantidades hasta 10 veces menores de forskolina ($10^{-7}M$) para lograr niveles más bajos de AMPc, se pueden observar claros efectos tanto de la clonidina (el agente con menor actividad intrínseca) como de la p-aminoclonidina y el UK-14304. El orden de potencia y de eficacia para estos tres derivados imidazolínicos, observado en los adipocitos de rata, es idéntico al observado en hamsters (Fig. 7).

HAMSTER

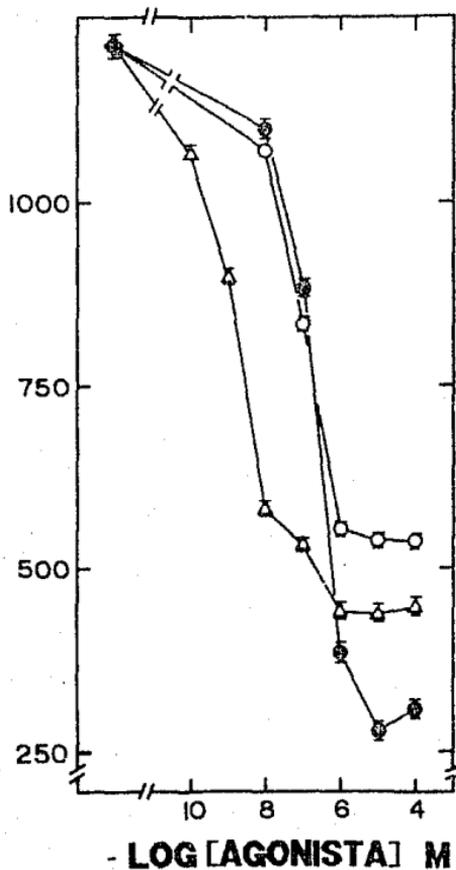


FIG. 5 EFECTO DE LA CLONIDINA, UK-14304, p-AMINOCLOMIDINA SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR FORSKOLINA EN ADIPOCITOS DE HAMSTERS. Los adipocitos fueron incubados en presencia de 10 μ M de forskolina sola (♦) o con diferentes concentraciones de UK-14304 (●) p-aminoclonidina (Δ) y clonidina (○) Valor basal de AMPc 98 \pm 2

HAMSTER

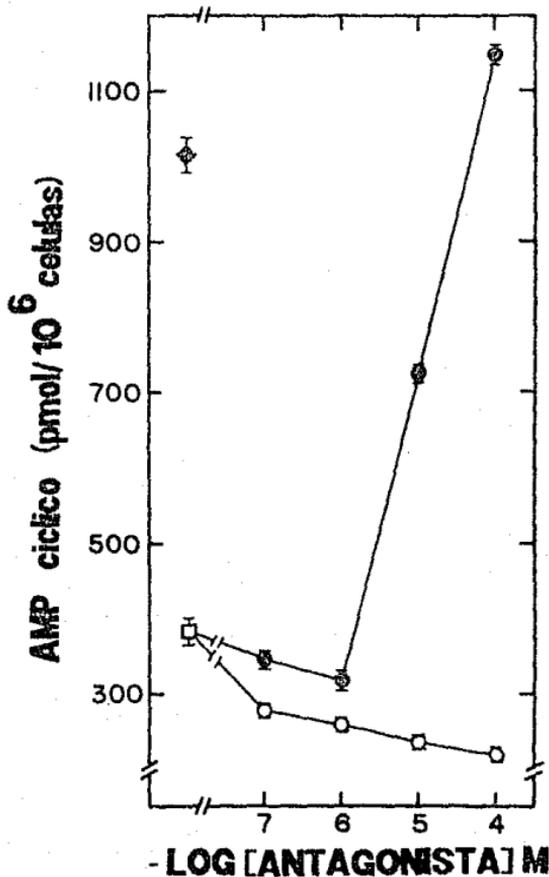


FIG. 6 EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ALFA ADRENERGICOS SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DEL UK-14304. Los adipocitos fueron incubados con 10 μ M de forskolina sola (◆) o con 10 μ M de UK-14304 (□) y diferentes concentraciones de yohimbina (●) o prazosina (○).
 Valor basal de AMPc 110 \pm 2

RATA

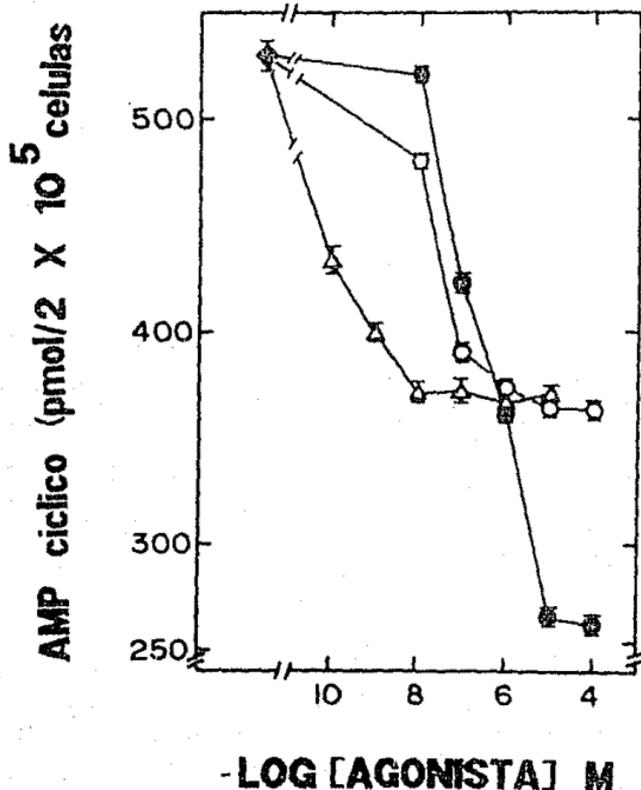


FIG. 7 EFECTO DE LA CLONIDINA, UK-14304, Y p-AMINOCLOPIDINA SOBRE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR FORSKOLINA EN CELULAS GRASAS DE RATA. Los adipocitos fueron incubados en presencia de 1 μ M de forskolina sola (♦) o con diferentes concentraciones de UK-14304 (■), clonidina (○) y p-aminoclonidina (△). Valor basal de AMPc 113 ± 1

Consistentemente el UK-14304, fue el agente más eficaz para inhibir la acumulación de AMPc y su efecto fue bloqueado, de manera dependiente de la dosis, por el antagonista alfa 2 adrenérgico yohimbina, pero no por la prazosina, un antagonista alfa 1 adrenérgico (Fig. 8).

Hasta aquí nuestros resultados muestran que el efecto inhibitorio de estos agentes es mediado por receptores alfa 2 adrenérgicos. En nuestro laboratorio previamente se había demostrado que la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa a través de receptores alfa 2, es regulada por una proteína G_i, en adipocitos de hamster (39,40). Para corroborar estos datos, se utilizaron adipocitos de hamster pretratados con toxina pertussis. La toxina pertussis causa una ADP ribosilación de la subunidad α_i de la proteína G_i, lo que resulta en una disminución en la sensibilidad a las aminas alfa 2 adrenérgicas en los adipocitos. Esta disminución en la sensibilidad no es exclusiva de los receptores alfa 2 adrenérgicos, sino que es común a aquellos agentes que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa (41).

Como se puede observar en la Tabla I, el efecto inhibitorio del UK-14304 y el ácido nicotínico (otro agente cuyos receptores se encuentran acoplados de manera inhibitoria a la enzima adenilato ciclasa), que se observa en células de hamsters control, se ve disminuido e incluso desaparece en células de animales previamente tratados con toxina pertussis.

De la misma manera, en los adipocitos de rata obtenidos de animales pretratados con toxina pertussis (Tabla II), la acción

RATA

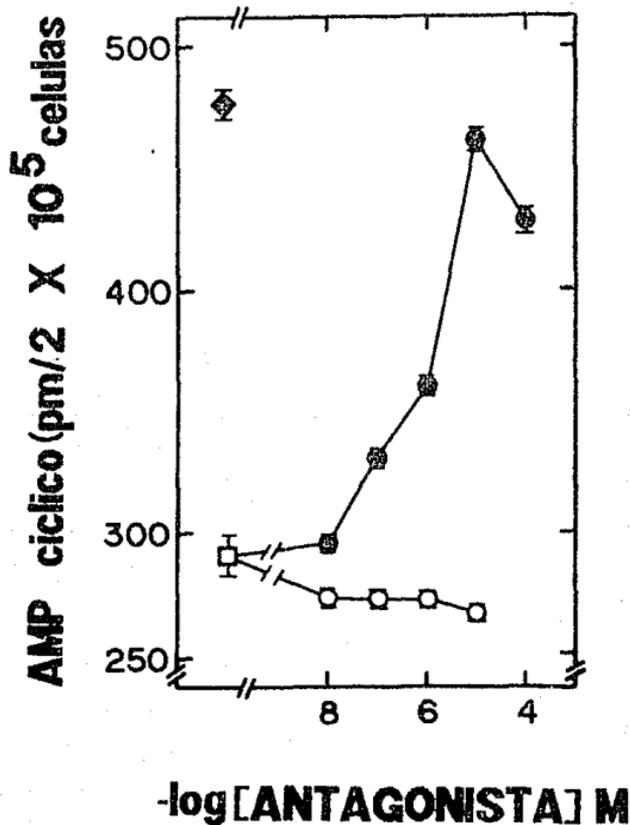


FIG. 8 EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS ALFA ADRENERGICOS SOBRE EL EFECTO INHIBITORIO DEL UK-14304. Los adipocitos fueron incubados con 1 μ M de forskolina sola (◆) y 10 μ M de UK-14304 (□) y diferentes concentraciones de yohimbina (●) o prazosina (○). Valor basal de AMPc 104 ± 2

ACUMULACION DE AMPc

(p.mol / 10 células)

A G E N T E	C O N T R O L	TOXINA PERTUSSIS	P
NINGUNO	102 + 29	119 + 14	.60
FORSKOLINA 10 M.	1277 + 81	2479 + 130	<.001
FORSKOLINA 10 M + UK -14304 10 M.	298 + 26	2220 + 139	<.001
FORSKOLINA 10 M + ACIDO NICOTINICO 10 M.	64 + 13	1694 + 191	<.001

TABLA 1. EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA INHIBICION POR UK - 14304 Y ACIDO NICOTINICO DE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR FORSKOLINA EN ADIPOCITOS DE HAMSTER. Los animales fueron tratados previamente con toxina pertussis y los adipocitos fueron incubados con los diferentes agentes a las concentraciones marcadas.

ACUMULACION DE AMPc

(pmol/ 2×10^5 células)

AGENTE	CONTROL	TOXINA PERTUSSIS	<u>P</u>
NINGUNO	146 ± 12	106 ± 11	0.025
FORSKOLINA 10^{-5} M.	3142 ± 223	1448 ± 145 *	< 0.001
FORSKOLINA 10^{-5} M + UK 14304 10^{-5} M.	2928 ± 170 **	1389 ± 33 *	< 0.001
FORSKOLINA 10^{-5} M + AC. NICOTINICO 10^{-4} M	179 ± 20	1257 ± 59	< 0.001
<hr/>			
FORSKOLINA 10^{-6} M	1465 ± 149 (b)	435 ± 19 *	< 0.001
FORSKOLINA 10^{-6} M + UK 14304 10^{-5} M	1108 ± 118 **	433 ± 37	< 0.001
FORSKOLINA 10^{-6} M + AC. NICOTINICO 10^{-4} M	179 ± 20	363 ± 31	< 0.001
<hr/>			
FORSKOLINA 10^{-7} M	531 ± 14 **	-	
FORSKOLINA 10^{-7} M + UK 14304 10^{-5} M	265 ± 15 **	-	
FORSKOLINA 10^{-7} M + AC. NICOTINICO 10^{-4} M	113 ± 16	-	

TABLA II. EFECTO DE LA TOXINA PERTUSSIS SOBRE LA INHIBICION POR UK-14304 Y ACIDO NICOTINICO DE LA ACUMULACION DE AMPc ESTIMULADA POR DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FORSKOLINA EN ADIPOCITOS DE RATA. Los animales fueron tratados previamente con toxina pertussis y una vez obtenidos, los adipocitos fueron incubados con los diferentes agentes a las concentraciones marcadas (* no hay diferencia significativa ** p 0.001, (a) 0.40 (b) 0.05)

inhibitoria del UK-14304 y el ácido nicotínico se bloquea. Además observamos una importante disminución en la sensibilidad a la forskolina, por lo que los niveles de AMPc, se ven disminuidos en comparación a los obtenidos con adipocitos de animales control.

DISCUSION

Se ha demostrado en muchos sistemas celulares que la actividad de la adenilato ciclasa es inhibida por un gran número de hormonas (42,52,53). El acoplamiento de receptores que inhiben a la enzima adenilato ciclasa ha recibido menos atención que la de los receptores que la activan.

En los adipocitos de hamster, se sabe que la lipólisis es regulada por efectos antagónicos de los diferentes receptores adrenérgicos, estimulación a través de los receptores beta e inhibición a través de los receptores alfa 2.

Además de los receptores alfa 2, se conocen otros receptores en las células grasas, que regulan la actividad de la adenilato ciclasa, como el receptor al ácido nicotínico, el de las prostaglandinas E₂, (43) y el receptor R_i para adenosina (44).

Se inició un estudio para comparar el efecto de algunas hormonas y una serie de agentes alfa adrenérgicos en los adipocitos de hamster. Aunque en nuestro mismo laboratorio se había caracterizado ampliamente al receptor alfa 2 y su efecto inhibitorio sobre la adenilato ciclasa, mediado por una proteína G_i, quisimos ampliar nuestro conocimiento utilizando una serie de nuevos agonistas alfa adrenérgicos.

Nuestros resultados muestran que los agonistas alfa 1, como el SGD-10175 y la metoxamina, tienen muy poco efecto sobre la acumulación de AMPc ya que como había mencionado anteriormente, el receptor alfa 1, presenta poco o ningún efecto sobre la acumulación de AMPc. Por otro lado los datos demuestran que estos

agentes tienen muy poca actividad sobre el receptor alfa 2 adrenérgico.

Cuando se utilizan agonistas alfa adrenérgicos no específicos, como el BHT-933 y la oximetazolina, observamos un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, aunque si se compara con el efecto de otros agonistas alfa 2, este resulta un efecto parcial, debido posiblemente a que no tienen una actividad intrínseca importante.

Cuando valoramos el efecto de los agonistas naturales, epinefrina y norepinefrina, sobre la acumulación de AMPc, observamos un efecto inhibitorio de ambas hormonas, desde muy bajas concentraciones y de una manera dependiente de la concentración.

Ambas hormonas presentan un efecto bifásico, ya que el efecto inhibitorio se presenta a concentraciones bajas y se revierte a concentraciones mayores. Esta respuesta bifásica es posiblemente debida a la eficiente estimulación de la respuesta beta adrenérgica, la cual sólo es prevenida parcialmente por el antagonista beta adrenérgico, propranolol.

La incubación de las células, con agonistas selectivos de la respuesta alfa 2 adrenérgica resulta en una clara inhibición de la acumulación de AMPc inducida por forskolina. Clonidina, p-aminoclonidina y UK-14304 presentan un efecto inhibitorio dependiente de la concentración. El efecto del UK-14304 es incluso mayor que el de los agonistas naturales. Esto último probablemente se deba a que a medida que se aumenta la concentración de los agonistas naturales, estos interaccionan con

receptores beta de las células, lo que no sucede con el UK-14304.

Por otra parte para documentar el perfil farmacológico de la inhibición de AMPc inducido por el UK-14304, examinamos los efectos de dos antagonistas alfa sobre la acción biológica del UK-14304. Observamos que la yohimbina, un antagonista alfa 2, altamente selectivo, bloquea totalmente el efecto del UK-14304, pero no sucede lo mismo cuando empleamos la prazosina, un antagonista selectivo del receptor alfa 1, lo que nos indica claramente que la acción del UK-14304 se debe a su interacción con receptores alfa 2 adrenérgicos.

Cuando estudiamos el efecto de las 3 imidazolininas sobre las células grasas de rata, observamos inicialmente que ninguno de ellos inhibía la acumulación de AMPc. Sin embargo, cuando la cantidad de forskolina fue disminuída 10 veces, se observaron efectos claros de inhibición de la ciclasa. El orden de potencia así como la eficacia para estos tres agentes, es muy similar a lo observado en hamsters. El UK-14304 fue nuevamente el agente más eficaz y su efecto fue bloqueado por la acción del antagonista alfa 2 yohimbina, pero no fue así con el antagonista alfa 1 prazosina.

Al obtener estos datos, ya no nos sorprendió, que tanto en los adipocitos de rata como en los de hamsters, obtenidos de animales pretratados con toxina pertussis, la acción inhibitoria del UK-14304 se encontraba bloqueada.

En los adipocitos de hamsters, el incremento de AMPc estimulado por forskolina, fue marcadamente potenciado por el tratamiento con toxina pertussis. Sin embargo en los adipocitos

de rata, observamos una importante disminución en la sensibilidad a la forskolina en animales pretratados.

Aunque otros estudios han mostrado ligeros decrementos en la estimulación por forskolina, después de un pretratamiento con toxina pertussis (45); la explicación para la reducción en los niveles de AMPc en adipocitos de ratas, pretratadas con toxina pertussis es desconocida.

Una posible explicación para estos resultados, es que la toxina pertussis no solo se encuentra alterando a la subunidad $\alpha 1$ de la proteína G1, sino que, posiblemente se encuentra alterando otras proteínas, entre las que podríamos encontrar a la adenilato ciclasa (que es donde actúa directamente la forskolina).(46)

Por otra parte, se sabe que existen diferentes variedades de la enzima adenilato ciclasa (47,48) lo que de alguna manera podría explicar la diferencia de resultados en la respuesta a forskolina entre los adipocitos de hamsters y de ratas, pretratados con toxina pertussis.

Nuestros datos en células grasas de rata, indican claramente que los adrenorreceptores alfa 2 se encuentran presentes y son funcionales en los adipocitos de rata. Estos receptores se encuentran acoplados de una manera inhibitoria a la enzima adenilato ciclasa, a través de una proteína G1 sensible a toxina pertussis.

La dificultad para detectar la acción alfa 2 adrenérgica en adipocitos de rata, se debe probablemente a la acción prominente de los receptores beta adrenérgicos en estas células. Por esta

20
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

razón, cuando se utilizan agentes con actividad tanto alfa como beta adrenérgica o agonistas sintéticos con baja actividad intrínseca, como la clonidina, es muy difícil observar la acción alfa 2 adrenérgica. Sin embargo, no podemos descartar que otros aspectos también contribuyen de manera muy significativa, ya que es sorprendente que en los adipocitos de rata, la inhibición alfa 2 adrenérgica se puede observar, sólo cuando los niveles de AMPc son muy bajos.

En contraste, observamos que aún cuando se utilicen niveles máximos de AMPc, el efecto inhibitorio del ácido nicotínico se puede observar muy claramente.

Por el contrario, en los adipocitos de hamster, la acción alfa 2 adrenérgica se observa claramente, aunque los niveles de AMPc se encuentren muy cercanos al nivel máximo.

Estos datos podrían ser explicados porque en la rata existiera una densidad muy baja de receptores alfa 2. Sin embargo, Rebourcet et al.(34) utilizando (3H)-UK-14304, detectó un número de sitios muy similar a lo observado en hamsters (740 fmol/mg proteína).

Otra posibilidad podría ser que existiera un ineficiente acoplamiento entre el receptor - proteína G α -adenilato ciclasa, sin embargo, no contamos con los suficientes datos como para apoyar esta posibilidad.

Por otra parte, se ha propuesto que existen 2 subtipos de receptores alfa 2, basándose en que los receptores alfa 2 adrenérgicos en varios tejidos exhiben marcadas diferencias en sus propiedades para reconocer ciertos ligandos.

La heterogeneidad de estos receptores, se ha basado

principalmente en estudios de asociación de ligandos radiactivos (49,50). Además se han clonado los genes para estos subtipos de receptores. Es interesante mencionar que la información genética para estos subtipos, se encuentra localizada en diferentes cromosomas en el humano (51).

Los receptores alfa 2 adrenérgicos, han sido subclasificados como alfa 2A y alfa 2B, basándose en sus afinidades relativas por la prazosina y la oximetazolina (50). El receptor alfa 2B, tiene una gran afinidad por la prazosina, mientras que la afinidad a este antagonista por el receptor alfa 2A, es aproximadamente 40 veces menor.

En nuestros experimentos, tanto en adipocitos de hamster como en adipocitos de rata, la prazosina fue totalmente incapaz de antagonizar los efectos del UK-14304, aún a muy altas concentraciones. Por otra parte los dos sistemas presentan un idéntico orden de potencia para las tres imidazolinas que inhiben la acumulación de AMPc. Esto sugiere que los adipocitos de ambas especies presentan receptores alfa 2 adrenérgicos, pertenecientes a la misma clase, es decir el subtipo alfa 2A.

En resumen, nuestros resultados indican que los receptores alfa 2 adrenérgicos se encuentran presentes y son funcionales en los adipocitos de rata, sin embargo, su respuesta sólo se puede observar cuando los niveles de AMPc no son muy altos.

Por otra parte, la acción alfa 2 adrenérgica en adipocitos de hamsters, es muy clara aún cuando los niveles de AMPc se encuentren muy cercanos al máximo.

Nuestros datos demuestran que el UK-14304, es un agente con

una eficacia muy alta, de tal manera que se podría considerar como una herramienta para estudiar las acciones alfa 2 adrenérgicas en otros modelos.

CONCLUSIONES

Se completó la caracterización del receptor alfa 2 adrenérgico en adipocitos de hamsters, observando que:

- El UK-14304 es el agente mas potente para inhibir la acumulación de AMPc estimulada por forskolina.
- Las acciones alfa 2 adrenérgicas sólo se pueden observar de manera parcial cuando se utilizan los agonistas naturales, epínefrina y norepinefrina, ya que a concentraciones mayores, comienzan a interactuar con el componente beta adrenérgico de las células.

En los adipocitos de rata, encontramos que:

- Los receptores alfa 2 adrenérgicos estan presentes y son funcionales.
- La respuesta de los receptores alfa 2 adrenérgicos en adipocitos de rata se puede observar claramente sólo cuando los niveles de AMPc no son muy elevados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- García-Saíñz, J.A.(1987) en " Mensaje Bioquímico " (L. Fernández, Y. Saldaña, S. Jiménez y S. Morales, eds.)
Vol. X : 177 - 210 pp.
- 2.- García-Saíñz, J.A. (1987) FCE-SEP, México 108 pp.
- 3.- Berridge, M.J. (1985) Sci. Amer. 253 (4):124-134.
- 4.- Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S. L., Krans, H. M. J.
(1971) J. Biol. Chem. 246 : 1877 - 1882.
- 5.- Ross, E. M., Howlett, A. G. (1978) J. Biol. Chem. 252 :
7224 - 7234.
- 6.- Pfeuffer, T. y Helmreich, E. J. M. (1975) J. Biol. Chem.
250 : 867 - 876.
- 7.- Neer, E. J. y Clapham, D. E. (1988) J. Biol. Chem.
263 : 2577 - 2580.
- 8.- Rodbell, M. (1980) Nature 284: 17-22.
- 9.- Katada T., Amano T., Ui, M. (1982) J. Biol. Chem 257 :
3739 - 3746.
- 10- Kobilka, B. K., Kobilka, T. S., Daniel, K. Regan J. W. Caron,
M. G. y Lefkowitz (1988) Science 240 : 1310 - 1316.
- 11- Gilman, A.G. (1987) Ann. Rev. Biochem. 56 : 615-649.
- 12- Hildebrandt, J.D., J. Codina and L. Birnbauer (1984)
J. Biol. Chem. 259 : 13178-13185.
- 13- Katada, T., J.K. Northrup, G.M. Bokoch, M. Ui y A.G.
Gilman. (1984) J. Biol. Chem. 259 : 3578-3585.
- 14- Lehninger, A.(1982) Bioquímica, Omega Barcelona 1117 pp.

- 15.- García-Saíñz, J.A. (1985) en " Pertussis Toxin " (Sekura, Moss and Vaughan. Eds).
- 16.- Hokin, L. E. (1985) Ann. Rev. Biochem. 54 : 205 - 235.
- 17.- Michell, R. H. (1979) Trends. Biochem. Sci. 4 : 128 - 131.
- 18.- Berridge, M. J. (1984) Biochem. J. 220 : 345 - 360.
- 19.- Downes, C. P. and Michell, R. H. (1985) en " Molecular Mechanisms of transmembrane signalling " (Cohen and Houslay, Eds.)
- 20.- González, R. A. and F. T. Crews.(1985) J. Biochem 232 : 799 - 804.
- 21.- Nishizuka, Y. (1986) Science 233:305-311.
- 22.- Dreher, M. L. (1986) Trends. Pharmacol. Sci. 9 : 114-115.
- 23.- Lefkowitz, R. J. y M. G. Caron (1988) J. Biol. Chem. 263 : 4993 - 4996.
- 24.- Fain, J. N. y García - Saíñz, J. A. (1983) Journal of Lipid Research 24 : 945 - 966.
- 25.- Morton, I. K. M. y Halliday J. (1981) en " Adrenoceptors and catecholamine action " , Part A (Kunos G. ed.) 69 - 97 pp.
- 26.- Pappano, A. J. (1981) en " Adrenoceptors and catecholamine action " , Part A (Kunos G. ed.) 69-97 pp.
- 27.- Dohlman, H. G., Caron. M. G., Lefkowitz, R. J. (1987) Biochemistry 26 : 2657
- 28.- Kunos, G. (1981) in " Adrenoceptors and catecholamine action " , Part A (Kunos G. ed.) 297-333p.
- 29.- García- Saíñz, J. A., Hoffman, B.E., Li, S., Lefkowitz, R.J and Fain, J.N. (1980) Life Sci. 27: 953 - 961.
- 30.- Lafontan, M. (1981) J. Lipid. Res. 22 : 1084 - 1093.

- 31.- Berlan, M., Carpéne, C., Lafontan, M. and Dangtran, L.
(1982) *Horm. Metab. Res.* 14 : 257 - 260.
- 32.- Burns, T. W., Lagley, P.E., Terry, B.E., Bylund, D. B.,
Hoffman, B. B., Tharp, M. D., Lefkowitz, R. J., García-
Saínz, J.A. y Fain, J. N. (1981) *J. Clin. Invest.*
67 : 467 - 475.
- 33.- Lawrence, J. C., y Larner, J. (1977) *Mol. Pharmacol.*
13 : 1060 - 1075.
- 34.- Rebourcet, M. C., Carpéne, C. y Lavau M. (1988)
Biochem. J. 252 : 679 - 682.
- 35.- Sekura, R. D., F. Fish, C. R. Manclarck, B. Meade y
Y. L. Zhang (1983) *J. Biol. Chem.* 258 : 14647 - 14651.
- 36.- Rodbell, M. (1964) *J. Biol. Chem.* 239 : 375 - 380.
- 37.- Gilman, A. G. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67:305 -
312.
- 38.- Brown, B. L., Albano, J. M. D., Elkens, P.R., Scherzi, Am M.
y Tampion, W. (1971) *Biochem. J.* 121 : 561 - 562.
- 39.- García-Saínz, J. A., B. B. Hoffman, Shih-Ying Li, (1980)
Life Sci. 27 : 953 - 961.
- 40.- Martínez-Olmedo, M. A. y J. A. García-Saínz. (1983) *Bioch.*
et Bioph. Acta. 760 : 215 - 220.
- 41.- Jones, B. S. y D. B. Bylund (1988) *J. Biol. Chem.*
263 : 14236 - 14244.
- 42.- Law, P. Y. y D. S. Hom (1982) *Mol. Pharmacol.* 22:1 - 4.
- 43.- Butcher, R. W. (1970) en " *Adipose Tissue. Regulation and
Metabolic Functions* ". Guest-Editors. 5 - 10 p.p.
Academic Press New York London.

- 44.- Londos, C., Cooper, D. M. F., Schlegel, W. et. al (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 5362 - 5366.
- 45.- Moreno, F. J., I. Mills, J. A. Garcia-Safnz y J. N. Fain
(1983) J. Biol. Chem. 258 : 10938 - 10943.
- 46.- Birnbaumer, L., Stengel, D., M. Desmier y J. Hanoune (1983)
Eur. J. Biochem. 136 : 107 - 112.
- 47.- Smigel, M. D. (1986) J. Biol. Chem. 261 : 1976 - 1982.
- 48.- Pfeuffer, E. R. F. Dreher, H. Metzger y T. Pfeuffer (1985)
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 : 3086 - 3090.
- 49.- Bylund, D. B. (1988) Trends. Pharmacol. Sci. 9 : 356.
- 50.- Jones, S. B. y D. B. Bylund (1988) J. Biol. Chem.
263 : 14236 - 14244.
- 51.- Frielle, T., Collins, S., Daniel, K. W., Caron, M. G.
Lefkowitz, R. J. y Kobilka, B. K. (1987) Proc. Natl. Acad.
Sci. U. S. A. 84 : 7920 - 7924.
- 52.- Jakobs, K. H. y G. Schultz (1980) Trends. Pharmacol. Sci.
1 : 331 - 333.
- 53.- Hothi, K. S., R. P. Leach y M. A. Titheradge (1988)
Biochem. J. 249 : 669 - 676.