

03081



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 13

2eg.

SUBTIPOS DE RECEPTORES ALFA - I
ADRENERGICOS Y SU REGULACION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

M. EN C. MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1991

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

Evolución del concepto de receptor.....	1
Receptores adrenérgicos.....	3
Respuesta α -1 adrenérgica.....	7
A) EL RECEPTOR α -1 ADRENERGICO.....	9
Subtipos de receptores α -1 adrenérgicos.....	11
a) Evidencias farmacológicas.....	11
b) Evidencias bioquímicas.....	15
c) Evidencias aportadas por la biología molecular.....	17
B) PROTEINA G.....	22
C) EFECTOR.....	25
OTROS EFECTORES.....	28
D) SEGUNDOS MENSAJEROS.....	29
a) IP_3 - Ca^{2+}	29
b) PK-C.....	32
Regulación de la respuesta α -1 adrenérgica.....	38
OBJETIVOS.....	41
Apéndice 1.	
Apéndice 2.	
Apéndice 3	
Apéndice 4.	
Apéndice 5.	
DISCUSION.....	43
CONCLUSIONES.....	46
BIBLIOGRAFIA.....	47

ABREVIATURAS

α	alfa
β	beta
	gama
δ	delta
ϵ	epsilon
$[Ca^{2+}]$	concentración de calcio libre
$[Ca^{2+}]_i$	concentración de calcio libre citosólica
5- MU	5-metil urapidil
ATP	adenosín trifosfato
C1-C4	regiones de homología constantes (1-4)
cdNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CEC	cloroetil-clonidina
COO ⁻	carboxilo
DAG	diacil-glicerol
Gs	proteína G asociada estimulatoriamente a la adenilato ciclasa
GTP	guanosín trifosfato
$[^{125}]HEAT$	ligando radiactivo para receptores α -1 adrenérgicos (ver Fig I.3)
IP ₂	inositol bifosfato
IP ₃	inositol trifosfato
Kb	kilobases
Kd	kilodaltones
α -Ph	alfa forbol
O-Me-PMA	derivado o-metil del acetato de miristoil forbol
NH ₂	amino

PhdBu	forbol dibutirato
PI	fosfatidil-inositol
PK-C	proteína cinasa C
PMA	acetato de miristoil forbol
RNAm	ácido ribonucleico mensajero

INTRODUCCION

Evolución del concepto de receptor.

A principios de siglo, Langley (1905) estudiando los efectos de la nicotina y el curare sobre el músculo estriado, encontró que ambos abolían el efecto de la estimulación nerviosa pero no la producida por la estimulación directa del músculo. Este otro tipo de estimulación requería de una substancia accesoria que recibiera el estímulo y a su vez lo transfiriera al material contráctil. Posteriormente percibió que su teoría podía ser más general y así estableció que: "Existen evidencias de que la mayoría de las substancias que ordinariamente se supone que actúan sobre las terminales nerviosas; como la nicotina, el curare, la atropina, la pilocarpina y la estricnina, actúan sobre las substancias receptoras de las células. Así como la adrenalina, una secreción interna, actúa sobre una substancia receptora, es posible que la secretina, la tiroidina y la secreción interna formada por los órganos generativos, también actúen sobre substancias receptoras, aunque en estos últimos casos las células pueden no estar conectadas con fibras nerviosas".

Posteriormente Hill (1909), Gaddum (1926) y Clark (1926a;b), contribuyeron al establecimiento de la teoría del receptor sobre bases más cuantitativas. Esto dió como resultado una teoría general acerca de la acción de las

drogas, la teoría de la "ocupación". La cual establece que la interacción droga-receptor sigue cercanamente la isoterma de adsorción de Langmuir, derivada de la ley de acción de masas. La teoría predice que la intensidad de los efectos farmacológicos de una droga, es directamente proporcional al número de los receptores ocupados por esta. Alternativamente a la teoría de la "ocupación, surgió otra teoría denominada de la "velocidad", en esta teoría se concebía la activación de un receptor como un evento cuántico asociado con el momento de interacción entre la droga y el receptor. Así se explica que una vez que el receptor ha sido ocupado, queda bloqueado por el agonista, mientras que la disociación deja al receptor disponible nuevamente para ser activado. De este modo una rápida velocidad de disociación da como resultado una alta eficacia, mientras que una lenta velocidad de disociación resulta en una ocupación prolongada del receptor y por ende en antagonismo (Paton, 1961).

Más tarde surgieron modelos más dinámicos, que llevaron a postular dos estados (Limber y Starke, 1983) y sitios cooperativos (Koshland et al, 1966). Estos modelos postulan que el receptor puede existir en dos estados interconvertibles, un estado basal y un estado activado, los cuales están en equilibrio entre sí. La respuesta biológica se inicia por el enlazamiento de un agonista a un receptor en estado activado que desplaza el equilibrio en favor de la activación del receptor. Al contrario un

antagonista se enlaza solo a los receptores en su estado basal impidiendo la formación del estado activado.

La teoría más reciente de la interacción de las drogas con los receptores, es la de la partición (Jenks, 1975; Franklin, 1980). Esta predice que la eficacia de un agonista depende de la energía libre de enlazamiento, que incluye la energía de enlazamiento "productiva", que induce un cambio conformacional efectivo biológicamente en el receptor y el enlazamiento "no productivo" típico de los antagonistas, que se interpreta como estrechez del enlazamiento (Franklin, 1980).

Receptores Adrenérgicos.

Dale en 1906 utilizó el concepto de sustancia receptora para explicar el mecanismo de acción de ciertas sustancias sobre el sistema nervioso simpático. Con éste, pudo explicar que los alcaloides del cornezuelo del centeno inhibieran solo las acciones excitadoras de la adrenalina sin afectar su acción inhibidora o las acciones excitadoras del bario. Posteriormente Cannon y Uridil (1921) sugirieron que existía un solo tipo de receptor en diferentes células efectoras que era capaz de inducir la liberación de sustancias excitadoras o inhibidoras, dependiendo de la célula efectora.

Sin embargo, en 1948 Ahlquist usando diferentes agonistas (epinefrina, norepinefrina, metilnorepinefrina, metilepinefrina e isoproterenol) en siete tejidos de cuatro

especies diferentes, encontró que existe el siguiente orden de potencia: isoproterenol > epinefrina > metilepinefrina > norepinefrina, en la vasodilatación y la estimulación miocárdica y sugirió que éste se debía a diferencias en los distintos receptores involucrados. El definió como alfa (α) a los receptores asociados con la mayoría de las funciones estimuladoras y al menos una inhibidora (la relajación del músculo liso intestinal) y como beta (β) a la asociada con la mayoría de las funciones inhibidoras y al menos una función estimuladora (la contracción cardíaca). La confirmación del trabajo de Ahlquist se obtuvo posteriormente, por una parte, con la utilización de los antagonistas dicloroisoproterenol (Powell y Slater, 1958) y propanolol (Moran y Perkins, 1958) y por otra, con la identificación y caracterización de los receptores β en una variedad de órganos y tejidos inervados o no. Más adelante, se encontró que la respuesta β implicaba la activación de la adenilato ciclasa (Robinson et al, 1967) y se sugirió que la respuesta α involucraba la inhibición de la adenilato ciclasa (Robinson et al, 1967; 1971).

Basados en estudios realizados con agonistas como la epinefrina, la norepinefrina y el isoproterenol; Lands et al (1967) postularon la subclasificación de los receptores β , en β_1 y β_2 . Posteriormente, se propuso la clasificación de los receptores α (Brown y Gillespie, 1957; Langer, 1977) con base en su localización anatómica; los receptores localizados postsinápticamente se denominaron $\alpha-1$ y se pensó

que tenían función excitadora y los receptores localizados presinápticamente se denominaron α -2 y se les atribuyó una función inhibitoria. Sin embargo, poco tiempo después se hizo aparente que había respuestas inhibitorias con localización postsináptica y se propuso que los receptores alfa deberían ser reclasificados siguiendo criterios funcionales. Así, Berthelson y Pettinger (1977) encontraron que los receptores postsinápticos inhibitorios, tanto para la liberación de renina como para la acción dispersante de gránulos inducida por la hormona estimulante de melanocitos; mostraban el mismo orden de potencia, que el que se encuentra para los receptores α -2 presinápticos. Este orden de potencia fue diferente al que se observó en el receptor α -1 postsináptico del músculo liso vascular.

Cabe mencionar que la clasificación realizada utilizando agonistas, tiene como base que éstos actuando sobre el mismo receptor tienen acciones cualitativamente similares en diferentes tejidos, sin embargo, su respuesta cuantitativa depende tanto de su afinidad como de su eficacia. De acuerdo con Graham y Lanier (1986), la determinación de las afinidades para los agonistas es compleja, por lo que se ha aceptado más ampliamente la clasificación de receptores con el uso de antagonistas ya que la comparación de las constantes de afinidad para antagonistas competitivos, se puede determinar tanto por medios farmacológicos como por estudios de enlazamiento con ligandos radiactivos. Se ha empleado un tercer método de

clasificación, el bioquímico, que utiliza como criterio el mecanismo de transducción de cada tipo de receptor (Graham y Lanier, 1986).

La confirmación de la clasificación funcional de los receptores α adrenérgicos de Berthelson y Pettinger (1977) vino después con la ayuda de dos criterios bioquímicos, uno de ellos fue el marcaje específico de los receptores en estudios de enlazamiento (Hoffman y Lefkowitz, 1980) y el otro se estableció por las diferencias en los segundos mensajeros que participan en cada una de las respuestas (Fain y García-Sáinz, 1980).

El apoyo farmacológico a la clasificación de los receptores alfa se basó en los estudios realizados utilizando agonistas y antagonistas. Por ejemplo, la prazosina es un antagonista alfa adrenérgico, selectivo para el receptor alfa-1, mientras que la yohimbina y la fentolamina son más potentes inhibidores de la respuesta α -2 (Bentley et al, 1977; U`Prichard et al, 1978; Wood et al, 1979). Sin embargo, estos últimos antagonistas son capaces de bloquear ambos tipos de receptores alfa, cuando se usan en altas concentraciones.

Los estudios de enlazamiento desarrollados antes de 1980, mostraron que la prazosina marcada era el compuesto de elección para la identificación de sitios α -1 adrenérgicos (Barnes et al, 1979), mientras que los derivados de la clonidina eran los compuestos adecuados para el bloqueo de los los sitios α -2 adrenérgicos (Rouot y Snyder, 1979).

Los criterios funcionales de clasificación pudieron ser utilizados hasta que se aclaró que las respuestas α -1 y α -2 adrenérgicas emplean diferentes mecanismos de transducción. Así, la respuesta α -1 se debe a un incremento en la concentración citosólica de calcio ($[Ca^{2+}]_c$) e involucra el recambio de fosfatidilinositol. En contraste, la respuesta α -2, se debe a la inhibición de la adenilato ciclasa (Fain y García-Sáinz, 1980). A partir de entonces, las respuestas adrenérgicas se han descrito como β , α -2 y α -1, pero conforme se ha avanzado en el conocimiento y la caracterización e identificación de los receptores adrenérgicos, se observó que existen subtipos y así tenemos al menos tres subtipos de receptores β , cuatro subtipos de α -2 y tres subtipos de α -1. A continuación se describirá como está constituido el sistema de transducción α -1 adrenérgico.

Respuesta α -1 adrenérgica.

Se puede considerar que la respuesta α -1 adrenérgica está constituida por tres elementos principales (ver figura I.1), el receptor α -1 adrenérgico, la proteína Gp (Gq), y la fosfolipasa C o efector. Además, se han descrito otros sistemas efectores, relacionados a la respuesta α -1 adrenérgica en sistemas particulares. La descripción general de cada uno de los elementos se hará a continuación.

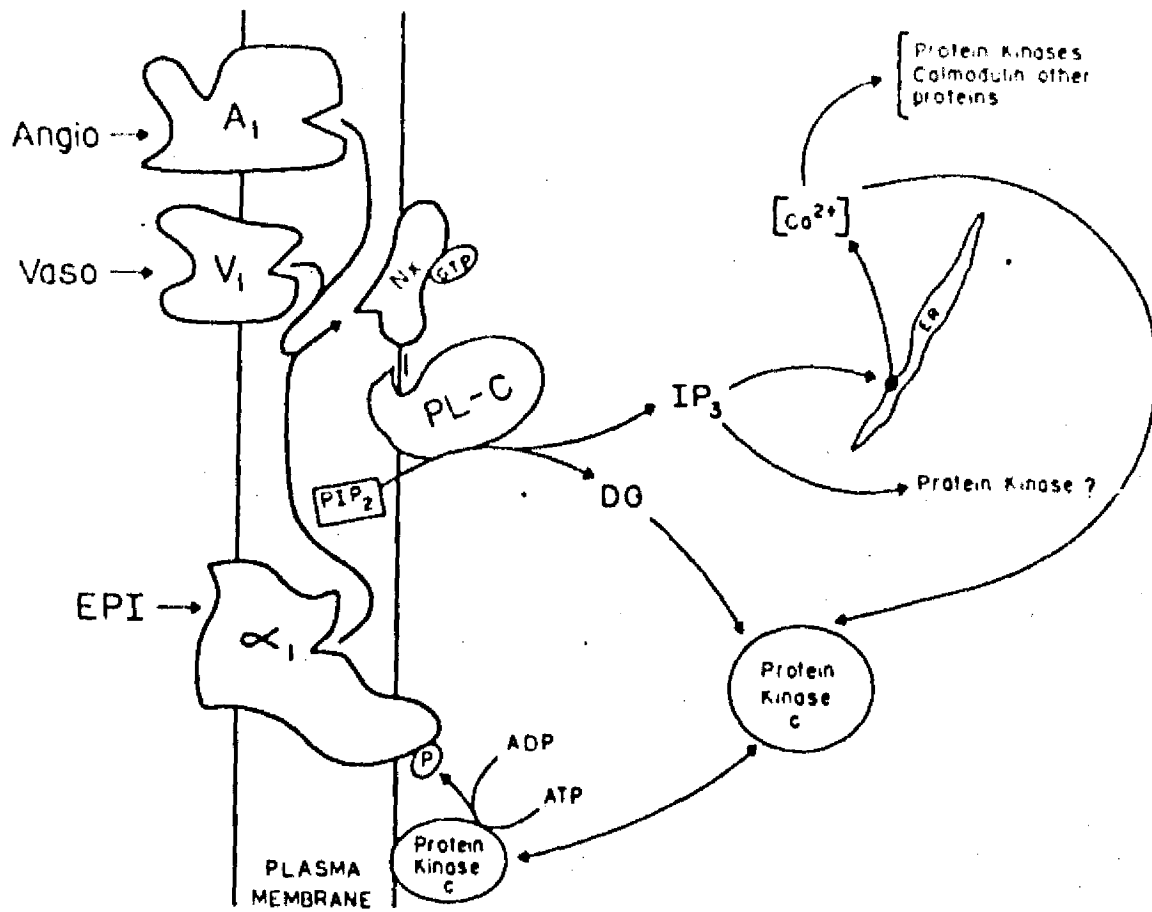


Figura I.1. Modelo para la transducción de la respuesta α -1 adrenérgica.

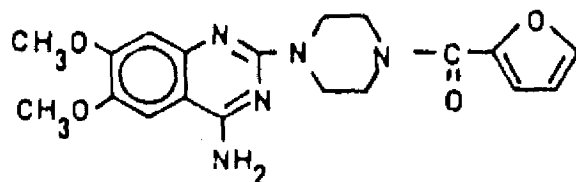
Las abreviaturas utilizadas son: EPI, epinefrina; Vaso, vasopresina; Angio, angiotensina. Los receptores involucrados son: α -1, V1 y A1; Nx (Gp), proteína reguladora enlazante de nucleótidos de guanina; PL-C, fosfolipasa C; PIP2, fosfatidilinositol bifosfato; DG, diacilglicerol; IP3, inositol trifosfato; ER, retículo endoplásmico.

Esquema tomado de García-Sáinz, 1987.

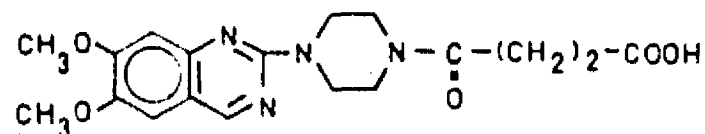
A) EL RECEPTOR α -1 ADRENERGICO. Además de los enfoques farmacológicos descritos con anterioridad, se realizaron algunos intentos bioquímicos para la identificación y purificación del receptor α -1 adrenérgico.

Uno de los primeros trabajos en este sentido fue el de Graham et al (1982) donde se describe una forma para solubilizar al receptor y se hace uso de una cromatografía de afinidad con el ligando CP 57609 (ver fig I.2) para el aislamiento del mismo. En este trabajo el peso molecular estimado del receptor es de 59 Kd. Posteriormente, Seidman et al (1984) sintetizaron un antagonista irreversible unido a un compuesto sensible a la luz para realizar el marcaje del receptor por fotoafinidad, la [125 I]-aril azidoprazosina (fig I.2). Con este compuesto se detectaron 3 bandas sensibles al fotomarcaje, de 77,68 y 59 Kd. También Dickinson et al (1984) utilizando el enfoque del fotomarcaje con un nuevo compuesto, y controlando de manera diferente las condiciones del ensayo, encontraron una sola banda de 82 Kd. En su caso utilizó el [125 I]A-55453 (fig I.2), también derivado de la prazosina pero que contiene una cadena hidrocarbonada mayor entre el arilo y la estructura base de la prazosina. Un intento posterior de la purificación del receptor fue el realizado por Leeb-Lundberg et al (1985), quienes obtuvieron una purificación de aprox 300 veces por medio de una cromatografía con Affi-gel A55414. Ellos reportaron una proteína de 80 Kd con el uso de otro reactivo para fotomarcaje el 125 I APDQ (ver fig I.2).

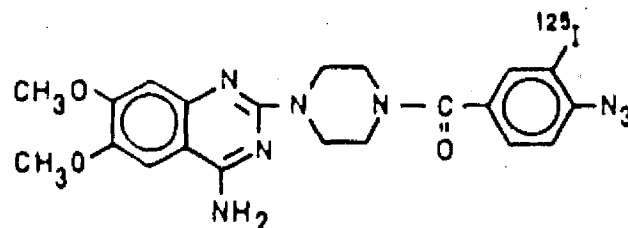
Figura I.2. Diferentes análogos de prazosina utilizados en estudios de fotomarcaje.



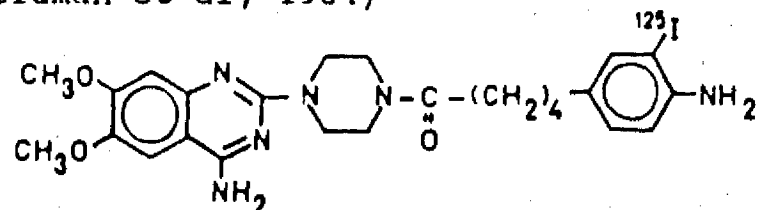
Prazosina



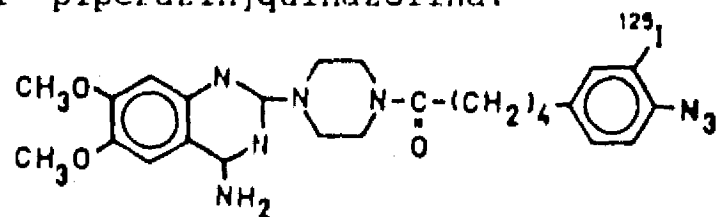
a) CP 57-609. 2-[4-(2-succinoyl)piperazin-1-yl]-4-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-5-one (Graham et al, 1982)



b) CP 65,526 o [^{125}I] aril-azido prazosina. 2-[4-(4-azido-3-iodobenzoyl)piperazin-1-yl]-4-amino-6,7-dimethoxyquinazolin-5-one. (Seidman et al, 1984)



c) ^{125}I -A 55453. 4-amino-6,7-dimethoxy-2[4'-5'-(3' [^{125}I]-iodo-4'-aminofenil)pentanoil]-1'-piperazin]quinazolin-5-one. (Dickinson et al, 1984).



d) ^{125}I APDQ. 4-amino-6,7-dimethoxy-2[4-[5-(4-azido-3- ^{125}I -iodofenil)pentanoil]-1-piperazinil]quinazolin-5-one. (Leeb-Lundberg et al, 1984)

En un trabajo mas reciente se reporta una purificación de 500 veces del receptor α -1 adrenérgico de cerebro, el cual parece diferir del aislado de hígado en sus características farmacológicas y cuyo peso relativo es de 80 Kd (Terman et al, 1990). Los pesos moleculares obtenidos para el receptor α -1 adrenérgico de diferentes tejidos, con los reactivos de fotomarcage enunciados se enlistan en la tabla I.1.

Subtipos de Receptores α -1 adrenérgicos.

Las evidencias que apoyan la existencia de subtipos de receptores, son del tipo tanto farmacológico como bioquímico y posteriormente las aportadas por la biología molecular.

a) Evidencias farmacológicas: Algunas evidencias farmacológicas sugerían la existencia de heterogeneidad en los receptores α -1 adrenérgicos (Ruffolo et al, 1977;1982; Morgan et al, 1984). La existencia de subtipos podía explicar por ejemplo, que el marcaje de los receptores aun en las mismas preparaciones de tejidos mostrara diferencias en los valores de Bmax utilizando ligandos con algunas diferencias estructurales (Morrow y Cresse, 1986). Por ejemplo, en hígado se reportaron diferentes valores para el número de receptores α -1 adrenérgicos por marcaje con ^3H -dihidroergocriptina, ^3H -prazosina, ^3H -epinefrina or ^3H -norepinefrina (Geynet et al, 1981; Hoffman et al, 1981; El-Refai et al, 1979; 1980;Guellaen, 1973).

Tabla I.1. Pesos moleculares de receptores α -1 adrenérgicos de diferentes tejidos obtenidos por reactivos de fotoafinidad.

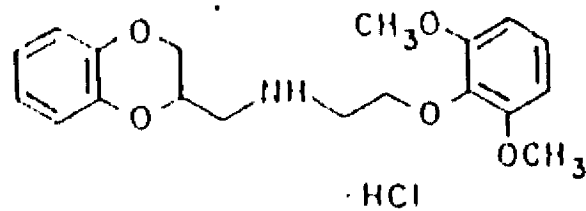
Reactivo	Tejido	Peso molecular Kd	Ref
^{125}I - A 55453	hígado de rata	82	Dickinson et al 1984
	bazo de cerdo	78	"
^{125}I - APDQ	corteza ce- rebral de rata	79	Leeb-Lundberg et al, 1983
	hígado de rata	80	Leeb-Lundberg et al, 1984.
	bazo de rata	79	"
	bazo de conejo	78	"
	pulmón de conejo	79	"
	músculo liso	85	"
	Cels DDT1	81	Cornett y Norris, 1985
^{125}I -CP-65526	hígado de rata	77	Seidman et al, 1984
	corazón de rata	77	Terman y Insel, 1986.

En 1986, Morrow y Creese, reportan que el [^3H]WB4101 (fig I.3) se une a dos sitios con diferente afinidad, uno en el rango picomolar y otro en el rango nanomolar. El WB4101 muestra entonces una mayor afinidad por un subtipo del receptor que previamente se ha denominado α -1A por su mayor afinidad a la fentolamina, que por el otro subtipo llamado α -1B.

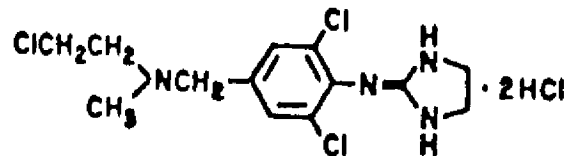
Posteriormente se desarrolló otro compuesto (ver figura I.3) la cloroetilclonidina (CEC), la cual permite distinguir el otro subtipo de receptor menos sensible al WB 4101 (Han et al, 1987). Con la aparición de estos dos compuestos se exploró en una gran variedad de tejidos la existencia de los subtipos de receptores α -1 adrenérgicos, mediante estudios de enlazamiento de un ligando radiactivo y su desplazamiento con los antagonistas mencionados. Entre estos tejidos están: el hipocampo (Han et al, 1987), el corazón (Guicheney and Meyer, 1982; Minneman et al, 1988), el riñón (Snaveley e Insel, 1982; Minneman et al, 1988), el cerebro (Johnson y Minneman, 1987; Wilson y Minneman, 1989; Gross et al, 1989) y la glándula submaxilar (Bylund et al, 1982; Michel et al, 1989).

Recientemente se describió otro compuesto aún más selectivo que el WB 4101 para la identificación farmacológica del subtipo de receptor adrenérgico α -1 A. Este compuesto se denominó 5-metil urapidil (5 MU) (ver figura I.3) y se ha utilizado en estudios de enlazamiento (Gross et al, 1989), para identificar a los subtipos de receptores presentes en

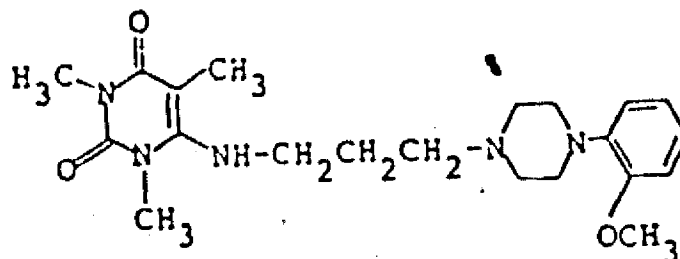
Figura I.3. Estructura química de los Antagonistas α -1 adrenérgicos.



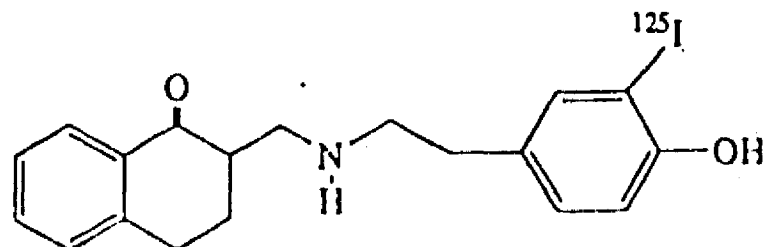
a) WB 4101 hidrocloreuro de N-[2-(2,6-dimetoxyfenoxi)etil]-2,3-dihidro-1,4 benzodioxin-2-metanamina



b) cloroetilclonidina (CEC) dihidrocloreuro de 2-[2,6-dicloro(N-beta-cloroetil-N-metil)-4-metilamino]fenil imino-2-imidazolidina



c) 5 metil urapidil (5-MU) 6-[3-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]propil-amino]-1,3,5-trimetil 2,4(1H,3H)pirimidindion



d) [^{125}I]HEAT (\pm)- β -[^{125}I]iodo-4-hidroxifenil)-etil-aminometil-tetralona

algunos tejidos como el cerebro, el corazón, el riñón y la glándula submaxilar (Michel et al, 1989; Gross et al, 1989; Hanft y Gross, 1989; Hoyer et al, 1990). El uso de este compuesto para la identificación bioquímica de los subtipos de receptores en hígado y en aorta, se ilustra en el apéndice 1 de esta tesis y en el apéndice 2 está la caracterización en el adipocito.

b) Evidencias bioquímicas: Al mismo tiempo que se daban avances en el area farmacológica, éstos se lograban en el área bioquímica. De las respúestas bioquímicas mediadas por el receptor se encontró, por ejemplo, que en el hígado los agonistas α -1 adrenérgicos eran capaces de estimular la glucogenólisis (Corvera y García-Sáinz, 1983) y la ureogénesis (Corvera y García-Sáinz, 1981). En el músculo liso estos compuestos eran capaces de estimular la contracción (Villalobos-Molina et al, 1982). Por otra parte, algunos resultados que no podían explicarse por un solo tipo de receptor α -1 adrenérgico, sugerían la existencia de subtipos de receptores y/o más de un mecanismo de transducción.

Basados en en el hecho de que los agonistas α -1 adrenérgicos, la angiotensina y la vasopresina, comparten el mecanismo de transducción surgieron algunas evidencias que sugieren la existencia de subtipos de receptores α -1 adrenérgicos que no tienen el mismo mecanismo de transducción o bien que existen mecanismos de transducción

adicionales en la respuesta α -1 adrenérgica. Entre éstas evidencias se puede citar las siguientes:

b.1) El efecto glucogenolítico de las hormonas vasopresina y angiotensina y el del ionóforo A23187, se abate en los hepatocitos de ratas hipotiroideas, a diferencia de lo observado en ratas normales, pero no así el de los agonistas α -1 adrenérgicos, como la epinefrina (Corvera y García-Sáinz, 1983).

b.2) Los ésteres de forbol inhiben la estimulación de la glucogenólisis estimulada por agentes α -1 adrenérgicos, pero no la inducida por angiotensina, vasopresina o A 231287 (Corvera y García-Sáinz, 1984).

b.3) La cicloheximida es capaz de semejar las acciones inducidas por agentes α -1 adrenérgicos y éstas se bloquean por el antagonista α -1 adrenérgico prazosina (Huerta-Bahena et al, 1982).

b.4) La insulina antagoniza las acciones de los agonistas α -1 adrenérgicos pero no las acciones de la vasopresina o la angiotensina (Pushpendran et al, 1984).

b.5) La respuesta ureogénica a agonistas α -1 adrenérgicos es independiente del Ca^{2+} extracelular, no así el de las hormonas vasopresoras (Hernández-Sotomayor y García-Sáinz, 1984, Corvera et al, 1984).

b.6) Los ésteres de forbol son capaces de inducir desensibilización a la respuesta α -1 adrenérgica, pero no a la respuesta de la vasopresina y la angiotensina (García-Sáinz et al, 1984).

b.7) Uno de los mecanismos de transducción α -1 adrenérgica, el compartido por las hormonas vasopresoras, se regula por el estado tiroideo, mientras que el otro parece ser regulado por glucocorticoides (García-Sáinz, 1987).

b.8) La sensibilidad al acetato de miristatoil forbol (PMA) no es la misma en la respuesta adrenérgica del hígado y la aorta (García-Sáinz et al, 1985).

En las discusiones de los diferentes apéndices se darán alternativas para explicar algunos de estos datos en función de la existencia de subtipos de receptores y/o los posibles puntos donde puede surgir una bifurcación en los mecanismos de transducción involucrados en la respuesta α -1 adrenérgica (ver apéndices 4 y 5).

c) Evidencias aportadas por la biología molecular. Por estudios realizados con biología molecular, se sabe que existen tres subtipos de receptores α -1 adrenérgicos denominados α -1 A, B y C, cuyas características se describen, a continuación.

α -1 B. El cDNA del receptor adrenérgico α -1B tiene un peso molecular de 2 Kb (ver Fig. I.4). Contiene después de una corta secuencia 5' que no se traduce, un marco de lectura abierta de 1545 pares de bases, seguido por una región 3' no traducida de 543 pares de bases y termina en un extremo poliadenilado. La secuencia de aminoácidos deducida de este gene, codifica para una proteína de 515 aminoácidos con un peso molecular de 56 Kd. Este peso

molecular coincide con el peso molecular aparente del receptor desglucosilado obtenido de células DDT-1 (Sawutz et al, 1987).

El análisis de hidrofobicidad para la secuencia predicha, revela 7 agrupaciones de residuos hidrofóbicos separados por fragmentos de residuos hidrofílicos. Las siete regiones hidrofóbicas se piensa que representan otros tantos dominios transmembranales conectados por tres asas extracelulares y tres asas citoplásmicas. El extremo amino está dirigido hacia el espacio extracelular y la proyección del carboxilo hacia el citoplasma. Los sitios potenciales para la glicosilación del receptor están presentes en los residuos de asparagina 10, 23, 28 y 33 del extremo amino. El extremo amino, el extremo carboxilo y la tercera asa citoplásmica representan los dominios más divergentes del gene, en relación a los genes de los otros receptores α -1 adrenérgicos. Por ejemplo, en este receptor α -1 B, el extremo carboxilo es más largo. Algunas serinas y treoninas presentes en la 2a y 3a asas citoplásmicas representan los sitios potenciales para la fosforilación llevada a cabo por la proteína cinasa C (PK-C) (Cotecchia et al, 1988). El gene que codifica para el adrenoceptor α -1 B se encuentra en el cromosoma 5 del cobayo (Schwin et al, 1990).

α -1 C. El gene que codifica para el adrenoceptor α -1C contiene una corta secuencia 5' no traducible de 96 pares de bases, una región de lectura abierta que codifica para 466 aminoácidos y una región 3' no traducible de 967 pares

Figura I.4 Estructura de los subtipos de receptores α -1 adrenérgicos.

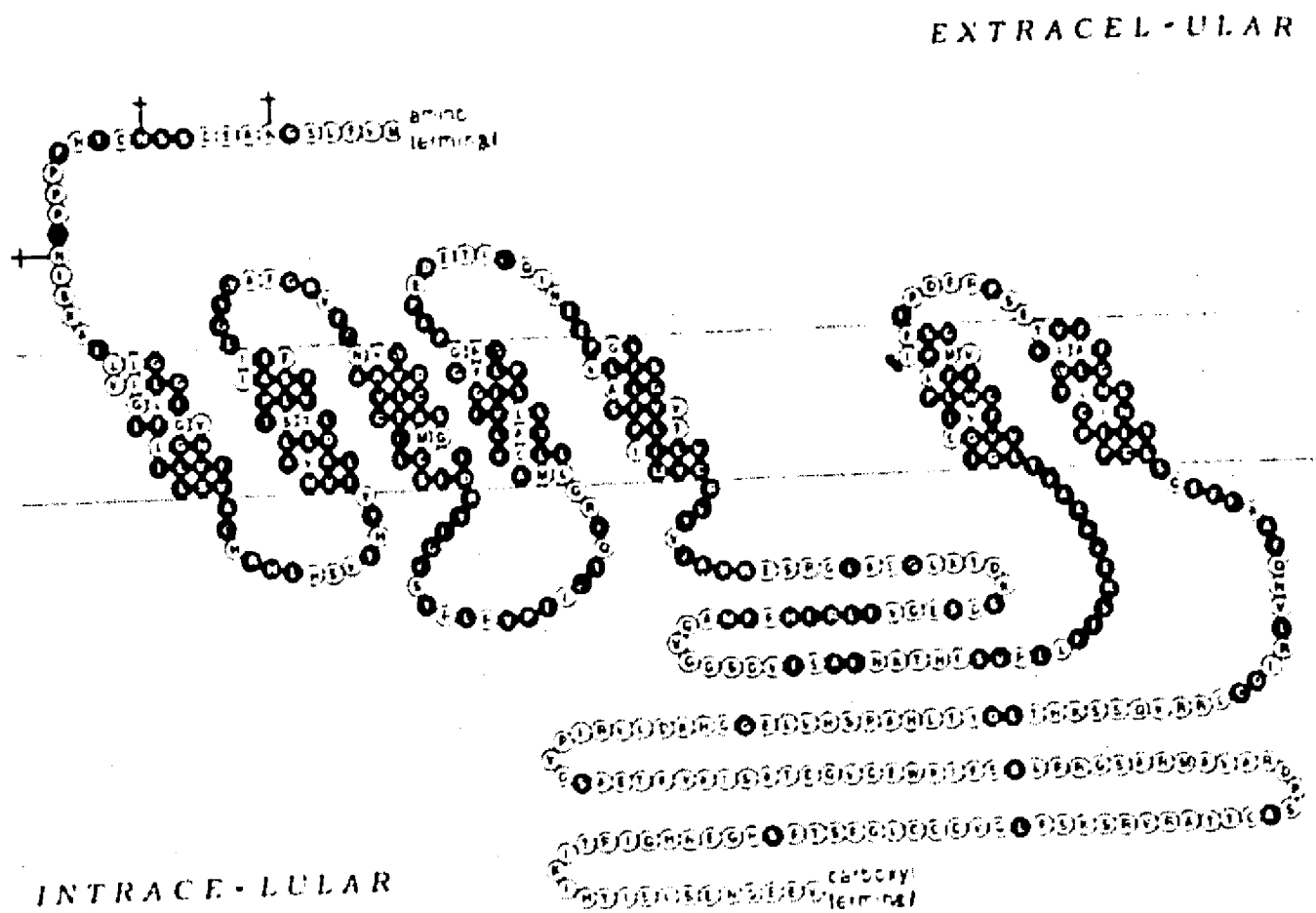
a) receptor α -1A (Lomasney et al, 1991)



b) receptor α -1B (Cotecchia et al, 1988)

	903
	957
	1011
	1065
39	1119
93	1173
147	1227
201	1281
255	1335
309	1389
363	1443
417	1497
471	1551
525	1605
579	1659
633	1713
687	1767
741	1821
795	1875
849	1929
	1983
	2037
	2091

c) receptor α -1C (Scwin et al, 1990)



de bases. El peso molecular obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos es de 51 Kd. El receptor muestra una gran homología con los otros receptores α -1 adrenérgicos en la secuencia que codifica para la región transmembranal, más estrictamente relacionada con la del receptor α -1 B. Existen 3 sitios potenciales para la glicosilación de la proteína en las asparaginas 7, 13 y 22 de la región amino terminal. Algunas serinas y treoninas presentes en la segunda y tercera asa representan regiones potenciales para la fosforilación por proteína cinasa C (PK-C). Entre los residuos 211-215 existe una región consenso susceptible de ser fosforilada por proteína cinasa A. Este gene se encuentra en el cromosoma 8 del humano (Schwin et al, 1990).

α -1 A . El gene que codifica para el adrenoceptor α -1A tiene en su extremo 5' una región no traducida de 480 pares de bases y una región no traducida en el extremo 3' de 789 pares de bases. El marco de lectura abierta de este gene contiene 1680 pares de bases que codifican para una proteína de 560 aminoácidos. El análisis de hidropatía confirma la gran homología que existe entre esta familia de subtipos de receptores α -1 adrenérgicos, que es de alrededor de 70%. Los sitios potenciales para glicosilación del extremo amino estan en las asparaginas 60 y 76. Algunas serinas y treoninas presentes en las asas intracelulares y el extremo carboxilo podrían ser los sitios potenciales de fosforilación por PK-C (Lomasney et al, 1991). El gene de

este receptor se ha localizado en el cromosoma 5 del humano (Yang-Feng et al, 1990).

B) PROTEINA G. La existencia de una proteína fijadora de GTP o proteína G participando en la respuesta α -1 adrenérgica se propuso, a la luz de las siguientes evidencias. 1) Los nucleótidos de guanina modulan la afinidad de los receptores para los agonistas, de manera similar a la de los receptores acoplados a la adenilato ciclasa. Esto es, que los nucleótidos de guanina disminuyen la afinidad del receptor por su agonista (El-Rafai, et al 1979; Geynet et al, 1982; Crane et al, 1982; Goodhart et al, 1982; Boyer et al, 1984; Lynch et al, 1985). 2) Los nucleótidos de guanina estimulan el recambio de fosfoinosítidos en membranas aisladas de hígado (Uhling et al, 1985; Wallace y Fain, 1985). 3) Se ha demostrado la activación de una GTPasa por el estímulo del agonista en membranas aisladas de hepatocitos (Fain et al, 1985). 4) Otro tipo de evidencia lo constituye la cinética de activación de la fosfolipasa C (efector) estimulada por análogos de GTP en eritrocitos de pavo (Boyer et al, 1989a).

En general las proteínas G son heterotrímeros constituidos de las subunidades α , β y γ . Las subunidades β y γ son proteínas de entre 35-36 y 8 Kd respectivamente y al parecer son compartidas por los diferentes tipos de proteínas G (Boyer et al, 1989b). Se ha sugerido que la función de las subunidades β y γ puede ser la de anclar a la subunidad α a la membrana (Sternweis, 1986), de promover el

intercambio de GDP en la subunidad α (Fung, 1983; Correze et al, 1987) y la de atenuar los eventos mediados por esta última subunidad (Katada et al, 1984a;b; Cerione et al, 1985). Las subunidades α son las que confieren especificidad al heterotrímero, esta subunidad se ha purificado y clonado de varias proteínas G de pesos moleculares entre 39 y 52 Kd (Gilman, 1987).

Uno de los primeros reportes que sugieren estar obteniendo una posible proteína G, fue en uno de los intentos de purificación de la fosfolipasa C. La proteína G co-extraída era de un peso molecular aprox de 56 Kd (Martin y Kowalchick, 1989). Recientemente se han obtenido preparaciones enriquecidas de lo que podría ser la proteína G acoplada a la fosfolipasa. Im et al (1990) reportan la obtención de una proteína de 74 Kd, que muestra actividad saturable de GTPasa, con una alta afinidad por nucleótidos de guanina y dependiente de magnesio. Esta proteína al ser reconstituida muestra una estimulación en su capacidad enlazante de GTP, por agonistas α -1 adrenérgicos. Por otro lado Taylor et al (1990) obtuvieron una preparación enriquecida de un "activador" de la fosfolipasa C, estimulable por nucleótidos de guanina con un peso molecular de 42 Kd. La caracterización posterior de esta proteína G por Wange et al (1991), indica que la activación por vasopresina induce el fotomarcaje de esta proteína G, en dos bandas una de 42 y otra de 43 Kd. El marcaje de estas proteínas requiere de magnesio y se estimula por

vasopresina, en el mismo rango de concentración de la hormona necesario para estimular la actividad de GTPasa. Estas proteínas "G" se identificaron como integrantes de la familia de proteínas Gq (Taylor y Exton, 1991), por medio de los anticuerpos previamente descritos para la detección de estas proteínas (Strathman y Simon, 1990; Strathman et al, 1989).

La proteína G involucrada en la estimulación de la fosfolipasa C no parece ser sensible a la acción de la toxina pertussis en una gran variedad de sistemas. Entre éstos se puede citar, el que no afecte el recambio de fosfatidilinositol (PI) en hepatocitos inducido por agonistas α -1 adrenérgicos, angiotensina o vasopresina (Pushpendran et al, 1983; Uhling et al, 1986; Johnson y Garrison, 1987), ni la estimulación α -1 adrenérgica en adipocitos cafés (Schimmel y Elliot, 1986). Sin embargo existen en la literatura reportes de la interacción de ésta toxina con la proteína G estimulada por agonistas α -1 adrenérgicos en membranas de hepatocitos (Tohkin et al, 1990). También parece afectar la producción de fosfatos de inositol en hepatocitos estimulados con factor epidérmico de crecimiento (Johnson y Garrison, 1987) y en adipocitos estimulados con agentes α -1 adrenérgicos (Moreno et al, 1983; Rapiejko et al, 1986). La toxina produce también, efectos diferenciales en la estimulación del recambio de fosfoinosítidos, dependiendo de si la respuesta se estimula por el receptor purinérgico o si ésta se induce con el

péptido quimiotáctico en células HL-60 (Cowen et al, 1990).

Las diferencias detectadas entre las proteínas G, estimuladas por diversos agonistas o su diferente sensibilidad a la toxina pertussis, tal vez puedan ejemplificar el concepto de flexibilidad en la transducción de las señales, atribuible a las proteínas G que fue propuesto por Taylor (1990) y sería posiblemente uno de los sitios donde pudiera haber diferencias entre el mecanismo de transducción α -1 adrenérgico en relación con los péptidos vasopresores, de los cuales se hablará más adelante.

C) EFECTOR. Originalmente la respuesta α -1 adrenérgica se había asociado solamente con un incremento en $[Ca^{2+}]_c$. Así, la participación de los fosfoinosítidos en el mecanismo de transducción de los receptores involucrados en el incremento de $[Ca^{2+}]_c$ fue propuesto inicialmente por Michell en 1975. Debido a que la disminución de PI estimulada por el agonista, no era inducida por un incremento en $[Ca^{2+}]_c$ y no era evitada por la eliminación de calcio del medio; se propuso que la hidrólisis de PI era independiente de los cambios en los niveles de calcio y podría ser en consecuencia un evento primario en el mecanismo de transducción de la señal que lleva a un incremento en $[Ca^{2+}]_c$. Se encontró también, que las hormonas que estimulaban incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ también inducían el recambio de PI. El recambio de PI inducido por agonistas α -1 adrenérgicos se había demostrado en: hepatocitos de rata (Kirk et al, 1977; Tolbert et al, 1980),

adipocitos de rata (Garcia-Sáinz y Fain, 1980a), adipocitos de cobayo (Garcia-Sáinz y Fain, 1980b) y aorta de gato (Lapetina et al, 1976), entre otros. Posteriormente se encontró que el evento inicial que desencadena la activación del receptor es una rápida hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, catalizado por la fosfolipasa C. Se observó, que el incremento en el recambio de fosfatidilinositol involucra el rompimiento de PI al diacilglicérido (DAG) con la liberación del fosfato de inositol, seguido por una resíntesis compensadora del PI. Este recambio de PI tampoco es secundario a la elevación de $[Ca^{2+}]_c$ (Michell, 1975). La conexión entre la formación de inositol trifosfato (IP_3) y el incremento en $[Ca^{2+}]_c$ se estableció posteriormente al demostrar que el IP_3 era capaz de liberar calcio del retículo endoplásmico (Berridge e Irvine, 1984). Como se ilustra en la sección de segundos mensajeros, la estimulación de la fosfolipasa C corresponde a un evento primario en el mecanismo de transducción de la respuesta α -1 adrenérgica.

Algunas de las características de la fosfolipasa C se mencionan a continuación. Las fosfolipasas C, constituyen una familia muy variada de isoenzimas que se han denominado α , β , γ , δ y ϵ , de acuerdo con el orden cronológico en que fueron descubiertas (Rhee et al, 1989). A pesar de catalizar la misma reacción, la estructura primaria de estas proteínas es muy diferente. Sin embargo, basándose en la comparación los sitios de homología en las secuencias nucleotídicas de

las diferentes isoenzimas, se ha sugerido que dos sitios, de 150 y 120 aminoácidos, con relativa alta homología entre las isoformas, pudieran participar en el dominio catalítico (Suh et al, 1988).

En el hígado se han detectado 2 de las isoformas de fosfolipasa C mencionadas anteriormente, una de 68 Kd (posiblemente α) y otra de 87 Kd (que podría corresponder a ν o ϵ) (Fukui et al, 1988). Cualquiera de las tres isoformas (α , o ϵ) tiene como substratos a los tres fosfoinosítidos conocidos: fosfatidil inositol, fosfatidil inositol monofosfato y fosfatidil inositol bifosfato y la única diferencia funcional que existe entre las isoformas que contiene el hígado, es que la forma α mantiene una pequeña actividad (25-33%) aun en ausencia de calcio, a diferencia de las otras isoformas cuya actividad es prácticamente nula en ausencia del metal divalente (Bennet y Crooke, 1987; Wilson et al, 1984).

Algunos autores consideran a la fosfolipasa con respecto a su localización, como citosólica (Takenawa y Nagai, 1981) y otros como membranal (Fukui et al, 1988); sin embargo, parece que las condiciones de aislamiento son la principal causa de la diferencia reportada por los autores. Esto es, que se puede tratar de una enzima débilmente unida a la membrana, por lo que dependiendo de lo estrictas que sean las condiciones de aislamiento, se puede obtener en uno u otro de los compartimientos (Rhee et al, 1989). Existe además, la posibilidad de coexistencia de varias isoformas

de la enzima en un mismo tipo celular (Meisenhelder et al, 1989; Wahl et al, 1989) lo que sugiere que cada isoforma puede estar relacionada con una función particular (Morris et al, 1990).

OTROS EFECTORES. Además de la fosfolipasa C, se han reportado otros sistemas efectores para la respuesta α -1 adrenérgica. En las células MDCK se ha observado la activación de las fosfolipasas C y A₂ por estímulos α -1 adrenérgicos. La temporalidad para la activación de las dos enzimas es diferente, la respuesta de la fosfolipasa A₂ es más rápida y transitoria. La activación del efector alternativo en éstas células, lleva a la formación de prostaglandina E₂ (Slivka e Insel, 1987). También se ha descrito la activación de la fosfolipasa A₂ en una línea celular obtenida de la glándula tiroides. Se sugirió además, que la activación diferencial de los sistemas efectores por la estimulación adrenérgica, se debe a que involucran diferentes proteínas G para su activación. Se sugiere que la proteína G acoplada a la fosfolipasa A₂ es sensible a la acción de la toxina pertussis, mientras que la relacionada con la fosfolipasa C no lo es (Burck et al, 1986).

En hepatocitos (Bocckino et al, 1987a;b) y neutrófilos (Cockroft, 1984), se ha reportado que la activación de la fosfolipasa D es consecuencia también, de la activación α -1 adrenérgica. La respuesta de esta fosfolipasa se observa como un incremento en la formación de ácido fosfatídico

(Bockino et al, 1987a) o de fosfatidiletanolamina, en presencia de etanol (Bockino et al, 1987b). La consecuencia final de esta respuesta podría ser que los niveles de DAG se regularan independientemente de los niveles de calcio intracelular.

Existen evidencias que sugieren la estimulación de la adenilato ciclasa como efector de la respuesta α -1 adrenérgica en hepatocitos de ratas envejecidas (Morgan et al, 1983).

D) SEGUNDOS MENSAJEROS. Como se mencionó previamente, la estimulación de la fosfolipasa C genera; IP_3 y diacilglicerol. Posteriormente, el IP_3 es capaz de liberar calcio de los almacenes intracelulares incrementando la concentración citosólica del ión $[Ca^{2+}]_c$, que a su vez está involucrado en la propagación de la señal. Por otro lado, el diacilglicerol tiene como blanco a la proteína cinasa C que se encarga de la activación de diferentes procesos celulares.

a) IP_3-Ca^{2+} . La producción de IP_3 estimulada por agonistas es instantánea y ha sido demostrada en varios tejidos (ver tabla I.2). Al parecer, no solo se produce el derivado trifosfatado como respuesta a la estimulación por el agonista; se han detectado también, inositol monofosfato, inositol difosfato (IP_2) y al menos dos compuestos trifosfatados; el inositol 1,3,4, trifosfato y el inositol 1,4,5 trifosfato, así como diferentes derivados cíclicos bi- o trifosfatados (Wilson et al, 1985; Dixon y Hokui, 1987).

Tabla I.2. Producción de IP₃ en varios tejidos.

Tejido	Refs.
Hígado	Thomas et al, 1984; Charest et al, 1985
cerebro	Berridge et al, 1983;
plaquetas	Agranoff et al, 1983; Rittenhouse y Sason, 1985
glándulas salivares	Berridge et al, 1983; Downes y Wustemann, 1983; Irvine et al, 1985
glándula pituitaria	Martin, 1983; Morgan et al, 1987
pancreas	Rubin et al, 1984; Morgan et al, 1985
corteza adrenal	Gallo-Payet et al, 1986
células endoteliales	Lambert et al, 1986
células de músculo liso	Akhtar y Abdel-Latif, 1984 Smith et al, 1984; Nelemans et al, 1990.
aorta	Tsujimoto et al, 1989.
corazón	Poggioli et al, 1986; Kohl et al, 1990.
linfocitos	Imboden y Stobo, 1985
células de la mucosa gástrica	Baudiere et al, 1986; Chew y Brown, 1986
células de astrocitoma	Masters et al, 1985
células de feocromocitoma	Vincentini et al, 1985a
adipocitos	Nanberg y Putney, 1986; Le y Fain, 1989.
tejido adiposo café	Schimmel, 1988

La generación de IP_3 o IP_2 puede ser resultado de una acelerada conversión de PI a IP_2 o IP_3 para reemplazar al fosfoinosítido bifosfatado utilizado por la fosfolipasa C (Griendling et al, 1986). Por otra parte los inositoles mono- y bi-fosfatados, también se pueden generar por la degradación del IP_3 llevada a cabo por las fosfomonoesterasas presentes en la célula, tanto en la membrana como en la fase soluble (Downes et al, 1982; Joseph y Williams, 1985; Shears et al, 1987). Se ha reportado la presencia de un derivado tetrafosfatado que podría estar involucrado en la entrada de Ca^{2+} extracelular. Este es producido por la IP_3 cinasa, enzima estimulada por Ca^{2+} -Calmodulina (Biden y Wolheim, 1986) que se ha aislado de varios tejidos incluyendo el hígado (Ryu et al, 1987). No obstante, se acepta en general que el 1,4,5 IP_3 es el agente capaz de liberar calcio del retículo endoplásmico. El sitio de liberación parece encontrarse en posibles regiones especializadas de éste organelo denominadas calciosomas (Volpe et al, 1988).

El calcio liberado del retículo endoplásmico, en el hepatocito alcanza hasta 5 veces su valor basal, el cual es alrededor de 200 nM (ver citas en: Altin y Bygrave, 1987; Moreno-Sánchez y Torres-Márquez, 1991). Estos valores se han obtenido en poblaciones celulares, no obstante, estudios realizados recientemente en células aisladas han mostrado que el incremento de calcio se da en espigas de liberación cuántica del segundo mensajero (Muallem et al, 1989), cuya

magnitud siempre es la misma y la amplitud entre espigas es dependiente del agonista y la concentración de éste utilizada (Rooney et al, 1989; Kawanishi et al, 1989). El calcio citosólico es capaz de activar vías como la glucogenólisis o participar en fenómenos como la secreción de insulina y la contracción del músculo liso (Albert y Tashjian, 1984; Vesperinas et al, 1989). Así también puede modificar la concentración de calcio de algunos compartimientos celulares como la mitocondria, donde al ser incrementado también parece incidir en vías bicompartimentalizadas compartidas por este organelo. Dos ejemplos de éstas vías son la ureogénesis y la gluconeogénesis, donde se ha sugerido: 1) la regulación directa por calcio de algunas enzimas, como la glutaminasa (Corvera y García-Sáinz, 1983b) o 2) la regulación por aumento del ATP disponible generado por la fosforilación oxidativa, como consecuencia de la estimulación de los diferentes elementos participantes en ésta última vía, que conllevaría a un aumento en las vías consumidoras de energía, como la ureogénesis y la gluconeogénesis (ver Moreno-Sánchez et al, 1991).

b) Proteína cinasa C (PK-C). La activación de la PK-C por el DAG sería capaz de regular diferentes procesos (ver tabla I.3). Estos procesos no son necesariamente regulados por una sola proteína, pues el término de PK-C se ha adjudicado a una familia de , hasta ahora 7 proteínas reportadas, que son estimuladas por calcio y fosfolípidos,

Tabla I.3. Proteínas y Procesos regulados por Proteína cinasa C

Proteína	Referencia
Receptores	
α -1 Adrenérgico	Corvera y García-Sáinz, 1984; Lynch et al, 1985; Leeb-Lundberg et al, 1985; Corvera et al, 1986
EGF (factor de crecimiento epidérmico)	Lee y Weinstein, 1978; Davis y Czech, 1984; Beguinot et al, 1985)
insulina	Thomopoulos et al, 1982; Jacobs et al, 1983
interleucina-2	Shackelford y Trowbridge, 1984
somatostatina	Matozaki et al, 1986
transferrina	May et al, 1984
inmunoglobulina E	Teshima et al, 1984
nicotínico de acetilcolina	Huganir et al, 1984
Procesos celulares	
Disminución de: (por PK-C)	
Respuesta purinérgico en	
-hepatocitos normales	Charest et al, 1985b ;
-células de hepatoma.	Torres-Márquez y Moreno-Sánchez, 1991.
-células WB	Hepler et al, 1988
Respuesta al péptido quimotáctico de neutrófilos	White et al, 1984; Naccache et al, 1985
Respuesta a la hormona liberante de tirotrófina en células de pituitaria.	Albert y Tashjian, 1985

continuación tabla I.3

Respuesta muscarínica colinérgica en hipocampo, células de astrocitoma y feocromocitoma.	Labarca et al, 1984; Orellana et al, 1985; Vincentini et al, 1985b
Respuesta α -2 adrenérgica en plaquetas y en células NG 108 15	García-Sáinz y Gutiérrez-Venegas, 1989; Convents et al, 1989
Respuesta al factor activador de plaquetas.	MacIntyre et al, 1985
Respuesta a Vasopresina Angiotensina y α -1 adrenérgicos	García-Sáinz et al, 1986a;b; García-Sáinz y Hernández-Sotomayor, 1987; Woods et al, 1987
Acción de VIP en células GH3	Quilliam et al, 1989
Respuesta a glucagon	García-Sáinz et al, 1990
Producción de AMPc en células NC B20 y NIH-3T3 por PK-C α	Gusovsky y Gutkind, 1991.
Aumento de (por PK-C)	
Respuesta β -adrenérgica o para Adenosina en cerebro, pinealocitos y células S49	Hollinsworth et al, 1985; Bell et al, 1985, Sudgen et al, 1985
Producción de AMPc en células PC12 por PK-C τ	Gusovsky y Gutkind, 1991
Actividad de Adenilato Ciclasa en células GH3	Quillan et al, 1989.
Otros procesos celulares	
Secreción de serotonina en plaquetas	Yamanishi et al, 1983; Rink et al, 1983
Secreción de amilasa en acinos pancreáticos	Wooten y Wren, 1984

continuación tabla I.3

Generación de superóxido o consumo de O ₂ en neutrófilos	Dale y Penfield, 1984; De Virgilio et al, 1984
Secreción de proteínas en glándulas parótidas	Putney et al, 1984
estimulación de liberación de insulina en islotes y células RIN MSF	Hutton et al, 1984; Malaise et al, 1984; Regazzi et al, 1989
liberación de prolactina por células de la pituitaria	Osborne y Tahjian, 1981 Delbeke et al, 1984
Contracción en músculo liso	Rasmussen et al, 1984; Apéndice 3
Estimulación del Na ⁺ /H en algunos tipos celulares	Besterman y Cuatrecasas, 1984; Burns y Rozenqurt, 1983; Moolenar et al, 1984
liberación de histamina en mastocitos	Katakami et al, 1984
liberación de catecolaminas en células cromafines adrenales	Pocote et al, 1985
Producción de los oncogenes c-Fos y c-Jun	Trejo y Brown, 1991
Regulación de la proliferación celular	Housey et al, 1988; Persons et al, 1988
Incremento en la fosforilación de una proteína de 80Kd asociada a la mitosis	Eurolinsky et al, 1988
Incremento en las propiedades de adherencia de células endoteliales, mediado por incremento en moléculas de adhesión (ICAM-1)	Lane et al, 1989

continuación tabla I.3

Regulación de canales de
Ca²⁺ en algunos tipos celulares (por PK-C)Incremento en el flujo de Ca²⁺

en aorta	Gleason y Flaim, 1986 Sperti y Colucci, 1987
en neutrófilos	Nasmith y Grinstein, 1987
en células de pituitaria	Albert et al, 1987
osteosarcoma UMR-106	Yamaguchi et al, 1981

Disminución en el influjo de
Ca²⁺ dependiente de voltaje en

células de músculo liso	Galizzi et al, 1987
" " feocromocitoma	Harris et al, 1986

Incremento en las corrientes de K⁺

corriente dependiente de voltaje y activadas por Ca ²⁺	Farley y Auerbach, 1986; Alkon et al, 1986
Canal de sodio	Costa y Catterall, 1985
ATPasa Na ⁺ /K ⁺	Green y Latimer, 1986
ATPasa de Ca ²⁺	Limas, 1980; Movsesian et al, 1984
Transportador de glucosa	Witters et al, 1985
antígeno HLA	Fluerstein et al, 1985
Proteína enlazante de granulos cromafines	Summers y Crutz, 1985
Proteína B50 sináptica	Kristjansson et al, 1982

Proteínas contráctiles y del citoesqueleto

cadena ligera de la miosina	Nishikawa et al, 1983
Troponina T e I	Mazei y Kuo, 1984
Vinculina	Werth et al, 1983
Filamina	Kawamoto y Hidaka, 1985

continuación tabla I.3

Caldesmon	Umekawa y Hidaka, 1985
Proteína C cardíaca	Lin et al, 1985
Proteína asociada a los microtúbulos	Takai et al, 1984
Enzimas	
Glucógeno fosforilasa cinasa	Kishimoto et al, 1977
glucógeno sintetasa	Ahmed et al, 1984
Fosfofructocinasa	Hofer et al, 1985
β -metil-glutaril-CoA reductasa	Beg et al, 1985
Tirosina hidroxilasa	Vuilliet et al, 1985
NADPH oxidasa	Dewald et al, 1984
Citocromo P-450	Vilgrain et al, 1984
Guanilato ciclasa	Zwiller et al, 1985
DNA metilasa	De Paoli-Roach et al, 1986
Cinasa de la cadena ligera de miocina	Nishikawa et al, 1983
Factor de iniciación 2	Schatzman et al, 1983
Otras proteínas	
Histonas H1, H2B y H4	Palvino et al, 1987; Morris y Rozengurt, 1988
Proteína S6 ribosomal	Le Peuch et al, 1983
Proteínas de Stress	Welch, 1985
Proteína pp60 src	Gould et al, 1985

con diferente capacidad de estimulación por estos agentes alostéricos (Nishizuka, 1988). Los diferentes elementos de la familia de PK-C comparten regiones de homología denominadas constantes (C1-C4). De estas regiones hidrofílicas, ubicadas en el extremo COO-terminal, C3 y C4 contienen el sitio enlazante de ATP y están presentes en todas las isoformas. Aquí también parece residir el sitio activo. Las regiones C1 y C2 localizadas en la región NH₂ están presentes en las isoformas α , β y γ y parecen contener el sitio regulatorio, enlazante de calcio y fosfolípidos. Las isoformas δ y ϵ solo contienen la región C1 de estos dominios reguladores y se ha sugerido que son muy débilmente reguladas por calcio (Nishizuka, 1988; Kikkawa et al, 1989). De estas proteínas se han detectado al menos dos isoformas en hígado, α y β , (Robles-Flores et al, 1991) y posiblemente en aorta las isoformas α y β o γ (Kariya et al, 1989).

Regulación de la Respuesta α -1 adrenérgica.

Hace algunos años se reportó en nuestro laboratorio que la respuesta α -1 adrenérgica en hígado puede ser bloqueada por ésteres de forbol, activadores de la PK-C (Corvera y Garcia-Sáinz, 1984). Sin embargo la glucogenólisis, inducida por ejemplo con vasopresina, angiotensina o por el ionoforo de calcio A23187, no se inhibió por estos agentes. Esto sugiere que la modificación inducida por estos derivados del forbol se presenta en etapas tempranas de la transducción de la señal. La inhibición inducida por acetato de miristoil

forbol (PMA) también se pudo observar en otras respuestas generadas por agonistas α -1 adrenérgicos, tales como la ureogénesis (ver apéndice 5), el incremento en IP_3 o Ca^{2+} por vasopresina (Woods et al, 1987) y el recambio de PI (ver apéndices 3, 4, 5 y Corvera et al, 1986).

Posteriormente se sugirió (Corvera et al, 1986) que el cambio inducido por la activación de la PK-C se debía a una fosforilación del receptor. Como se muestra en los trabajos de Corvera et al (1986), el tratamiento de los hepatocitos con PMA cambia el estado de afinidad de los receptor α -1, lo que sugiere que se ha modificado, posiblemente debido a una fosforilación. En este sentido, el trabajo de Leeb-Lundberg et al (1987) muestra la fosforilación del receptor α -1 adrenérgico. El efecto inducido por PMA, también se observa con otros agentes, como la vasopresina, la angiotensina, los agonistas α -1 adrenérgicos (ver García-Sáinz, 1987); capaces de estimular a la PK-C por mediación de su activador natural el DAG (Castagna et al, 1982). La fosforilación en este caso parece no llevarse a cabo a nivel del receptor y se ha sugerido, al menos para el caso de la activación β adrenérgica, que puede ser a nivel de la proteína Gs. Algunos de los datos obtenidos en este sentido, se ilustran y discuten en los apéndices 3,4 y 5.

La desensibilización o disminución de la respuesta por una estimulación previa del receptor, es otro de los mecanismos reguladores de la respuesta α -1 adrenérgica; puede ser de tipo homólogo cuando es inducida por el mismo

agente o de tipo heterólogo cuando es inducida por otra hormona o por PMA. La participación de la PK-C parece llevarse a cabo en cualquiera de estos tipos de desensibilización, aunque el substrato de la cinasa dentro del proceso de transducción puede variar. En el receptor β es donde el fenómeno ha sido más estudiado, aunque ya se han presentado algunas evidencias en este sentido para la respuesta α -1. Así por ejemplo en la desensibilización homóloga, la fosforilación parece ser a nivel del receptor y requiere de la ocupación del mismo (Bouvier et al, 1987), mientras que en la desensibilización heteróloga se ha sugerido que el compuesto fosforilado es la proteína "G" (Sibley et al, 1988).

Además de la participación de la PK-C en la desensibilización, otros fenómenos pueden llevarse a cabo en este proceso, por ejemplo, el vaciado de las pozas de calcio, como se puede observar cuando se está midiendo el incremento de este ion en citoplasma o algún fenómeno dependiente de éste (ver apéndice 5 y Torres-Márquez y Moreno-Sánchez, 1991). Otros procesos también involucrados pueden ser la disminución del RNAm que codifica para el receptor (Hadcock et al, 1989; Izzo et al, 1990) o la endocitosis, como se ha sugerido para el receptor β en el caso de la desensibilización a largo plazo (Mickey et al, 1975; Karliner et al, 1986).

OBJETIVOS

Con base en las evidencias farmacológicas, bioquímicas y de biología molecular que sugieren la existencia de subtipos de receptores α -1 adrenérgicos, así como su regulación diferencial, nos planteamos estudiar en esta tesis: los subtipos de receptores α -1 adrenérgicos presentes en hígado, aorta y adipocito y la regulación de esta respuesta α -1 adrenérgica.

Para tal objeto se adjuntan cinco apéndices y una discusión general.

Los primeros dos apéndices versarán sobre el subtipo de receptor α -1 adrenérgico en hígado y aorta (Apéndice 1) y adipocitos (Apéndice 2). Estos sistemas se seleccionaron debido a las diferencias que muestran entre si en cuanto a su estimulación por agonistas, regulación por PK-C y sensibilidad a toxina pertussis.

Los últimos tres apéndices serán sobre la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica en 3 diferentes modelos: hepatocitos y aorta (Apéndice 3), con la idea de profundizar en la diferencia de la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica por PK-C en los subtipos α -1A y α -1B; hepatocitos de ratas obesas Zucker (Apéndice 4), con la idea de ver si existen diferencias en la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica por diferentes isoenzimas de la PK-C y el último modelo presentado es la desensibilización de hepatocitos de rata normal e hipotiroidea (Apéndice 5), con el fin de

comparar la desensibilización homóloga y heteróloga, tanto como para saber si existe participación exclusiva de una de las isoformas de PK-C.

Apéndice 1

European Journal of Pharmacology - Molecular Pharmacology Section, 206 (1991) 199-202
© 1991 Elsevier Science Publishers B.V. 0922-4106/91/\$03.50
ADONIS 0922410691000782

EJPMOL 90153

α_1 -Adrenoceptor subtypes in aorta (α_{1A}) and liver (α_{1B})

Ma. Eugenia Torres-Márquez^{1,2}, Rafael Villalobos-Molina³ and J. Adolfo García-Sáinz¹

¹Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM; ²Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, and ³Sección de Terapéutica Experimental, Departamento de Farmacología y Toxicología, CINVESTAV-IPN, Mexico City, D.F., Mexico

Received 9 May 1990; revised MS received 28 September 1990; accepted 27 November 1990

The effect of several α_1 adrenoceptor antagonists on the α_1 -adrenoceptor-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling was studied comparatively in rat hepatocytes and rabbit aorta. It was observed that 5-methyl urapidil and WB 4101 were much more potent in rabbit aorta than in hepatocytes. The orders of potency were prazosin \gg 5-methyl urapidil \geq WB 4101 in liver cells and WB 4101 \geq 5-methyl urapidil = prazosin in aorta. Treatment with chlorethylclonidine inhibited 70-80% of the stimulation of labeling induced by epinephrine in rat liver, but only 30-40% of that in aorta. Our data suggest the existence of two pharmacologically distinct receptors in these tissues i.e. α_{1A} -adrenoceptors in aorta and α_{1B} in liver cells.

α_1 -Adrenoceptor subtypes: Liver cells: Aorta: 5-Methyl urapidil

1. Introduction

α -Adrenoceptors were initially divided into two subtypes, i.e. α_1 - and α_2 -adrenoceptors, on the basis of their affinities for agonists and antagonists and their mechanisms of signal transduction (Berthelsen and Pettinger, 1977; Fain and García-Sáinz, 1980). Pharmacological and molecular biological evidence for subtypes of the α_2 -adrenoceptors already exist (Kobilka et al., 1987; Bylund, 1988; Regan et al., 1988).

Regarding the α_1 -adrenoceptors, there is increasing evidence from radioligand and functional studies that this type of receptor can be further subdivided into two pharmacologically distinct subtypes (α_{1A} and α_{1B}), although this remains controversial (Flavahan and Vanhoutte, 1986; Hieble et al., 1986; Docherty, 1987; McGrath and Wilson, 1988; Minneman, 1988). Three adrenergic antagonists seem to be especially useful to distinguish between these adrenoceptor subtypes: 5-methyl-urapidil (6-[3-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]propyl-amino]-1,3,5-trimethyl-1,2,4-[¹H,³H]pyrimidindione) (Gross et al., 1988; Hoyer et al., 1990), chlorethylclonidine (Han et al., 1987, 1988) and WB 4101 [2-(2,6-dimethoxyphenoxyethyl) aminomethyl-1,4-benzodioxane] (Morrow and Creese, 1986).

Previous work from our laboratory has shown that

α_1 -adrenergic activation in rat liver and rabbit aorta leads to phosphoinositide turnover but that some agents, such as methoxamine, although interacting with the α_1 -adrenoceptors in both tissues, were only able to activate the receptors in aorta (García-Sáinz et al., 1985). These findings were confirmed and extended by other groups measuring phosphorylase activation and cytosolic calcium (Tsujimoto et al., 1989). The possibility that the different response in these tissues could be due to receptor subtypes has been suggested (García-Sáinz et al., 1985; Tsujimoto et al., 1989).

The present study was undertaken to study comparatively the sensitivity of the α_1 -adrenergic-mediated phosphoinositide turnover to 5-methyl-urapidil, chlorethylclonidine and WB 4101. Our results show clear differences in sensitivity to these agents and further support the suggestion that these tissues have different receptors, i.e. α_{1A} -adrenoceptors in rabbit aorta and α_{1B} in rat liver cells.

2. Materials and methods

1-Epinephrine and propranolol were obtained from Sigma Chemical Company. Chlorethylclonidine and WB 4101 were from Research Biochemicals Inc. [³²P]PI (carrier free) was from New England Nuclear. Prazosin was a generous gift from Pfizer and 5-methyl-urapidil was generously provided by BYK-Gulden Pharmazeutike.

The methodology to study phosphatidylinositol (PI) labeling has been described in detail elsewhere (Tolbert

Correspondence to: J. Adolfo García-Sáinz, Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Ap. Postal 70-248, 04510 Mexico City, D.F., Mexico

et al., 1980; Villalobos-Molina et al., 1982). In brief, isolated rat hepatocytes (Berry and Friend, 1969) or rings of rabbit aorta were incubated for 60 min in medium containing 10 μ Ci/ml of [32 P]Pi. At the end of incubation lipids were extracted and phospholipids separated by thin layer chromatography (García-Sáinz and Fain, 1980). When the inhibitory effects of prazosin, 5-methyl-urapidil and WB 4101 were studied, these agents were present simultaneously with epinephrine. Chlorethylclonidine is a derivative of clonidine that irreversibly inactivates α_1 -adrenoceptors (Han et al., 1987). To study its action hepatocytes or rings of aorta were preincubated for 15 min with chlorethylclonidine and then washed before being incubated with epinephrine and [32 P]Pi. Phosphorylase activation was studied by the method of Stalmans and Hess (1975) in liver cells incubated for 1 min with the agents.

3. Results

Basal labeling of phosphatidylinositol was identical to that observed previously (García Sáinz et al., 1985). Epinephrine stimulated in a dose-dependent fashion the labeling of phosphatidylinositol both in hepatocytes (fig. 1A) and aorta (fig. 1C). The magnitude of the effects, the EC_{50} 's and the amount of label incorporated were similar to values observed previously (Villalobos-Molina et al., 1982). Prazosin and 5-methyl urapidil were without effect on the basal labeling of phosphatidylinositol in both preparations. The effect of 10 μ M epinephrine was dose-dependently blocked by these antagonists in both tissues (fig. 1, panels B and D); the curves for inhibition of the α_1 -adrenergic action were rather shallow whereas those obtained with aortic rings were steep. 5-Methyl urapidil had a potency similar to that of prazosin in aorta but it was approximately 100-times less potent than prazosin in liver cells (fig. 1, panels C and D).

WB 4101 dose-dependently inhibited the α_1 -adrenergic stimulation of PI labeling (fig. 2). Interestingly, with this antagonist, the profile was similar to that observed with 5-methyl urapidil, i.e. WB 4101 very potently antagonized the effect of epinephrine in aorta but was rather weak in liver cells (fig. 2). The difference in potency observed in these tissues was approximately 2 orders of magnitude. WB 4101 did not alter the basal labeling of PI in these tissues.

Since hepatocytes can actively metabolize many drugs, the effect of the antagonists was also assayed measuring a rapid response. Phosphorylase can rapidly be activated by epinephrine (maximum in approximately 30 sec; 3-4-fold increase in activity). Using 1-min incubations we observed that the potency order of the antagonist was the same as that observed in the PI labeling studies, i.e., prazosin ($IC_{50} = 30$ nM) > 5

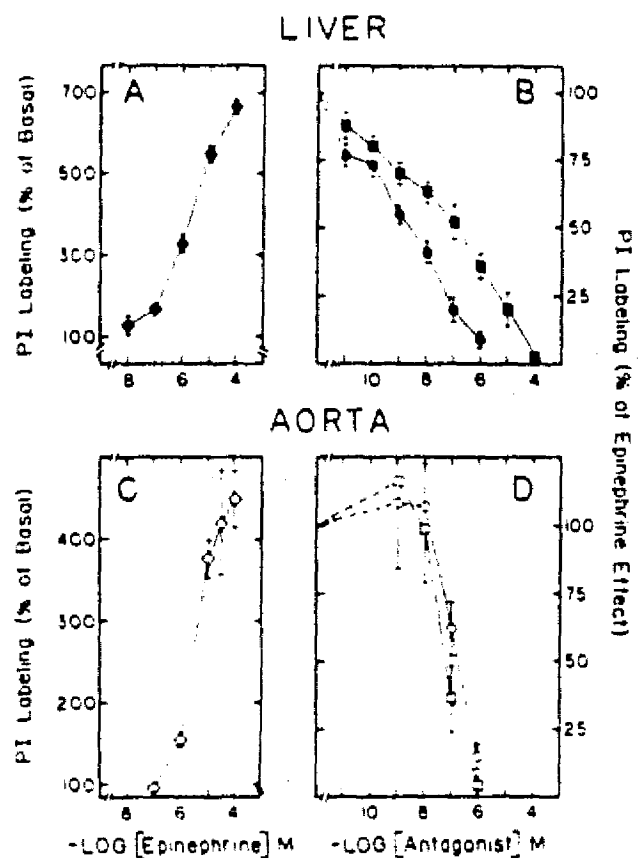


Fig. 1. Effect of adrenergic agents on the labeling of phosphatidylinositol. Liver cells (A and B) or rings of aorta (C and D) were incubated with different concentrations of epinephrine (A and C) or with 10 μ M epinephrine plus different concentrations of prazosin (circles) or 5-methyl urapidil (squares) (B and D). Results are expressed either as percentage of basal labeling (panels A and C) or as percentage of the stimulation induced by 10 μ M epinephrine (panels B and D). Plotted are the means, and vertical lines represent the SE of 6-10 determinations using different preparations.

methyl-urapidil ($IC_{50} = 500$ nM) \geq WB 4101 ($IC_{50} = 1$ μ M).

Preincubation with chlorethylclonidine inactivated dose-dependently the α_1 -adrenoceptors of hepatocytes as evidenced by the diminished effect of a fixed concentration of epinephrine (fig. 3). The inhibition observed was approx. 75-80% which is in agreement with the data of Han et al. (1987). In contrast, in rabbit aorta the inhibitory action of chlorethylclonidine was only significant at the higher concentration tested (100 μ M) and the magnitude of inhibition was only 30-40% of the effect of epinephrine. Chlorethylclonidine did not alter the basal labeling of PI in these tissues.

4. Discussion

Our present results show clear differences in sensitivity to several antagonists of the α_1 -adrenoceptor-mediated turnover of phosphoinositides. In these experiments

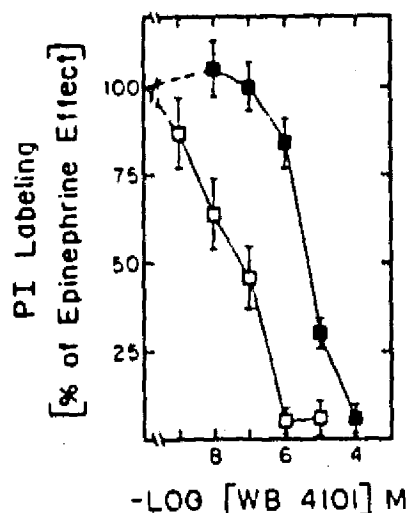


Fig. 2 Effect of WB 4101 on the α_1 -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol-labeling. Liver cells (●) or rings of aorta (□) were incubated with $10 \mu\text{M}$ epinephrine and different concentrations of WB 4101. Results are expressed as percentage of the stimulation induced by $10 \mu\text{M}$ epinephrine. Plotted are the means, and vertical lines represent the SE of 6-10 determinations using different preparations.

labeling of PI was studied; although admittedly this is a secondary effect due to the initial breakdown of phosphatidylinositol 4, 5, biphosphate (Berridge and Irvine, 1984), it is an easily quantifiable large response which was similar in both tissues and allowed us to unambiguously define the differences. The order of potency observed in liver (prazosin \gg 5-methyl urapidil \geq WB

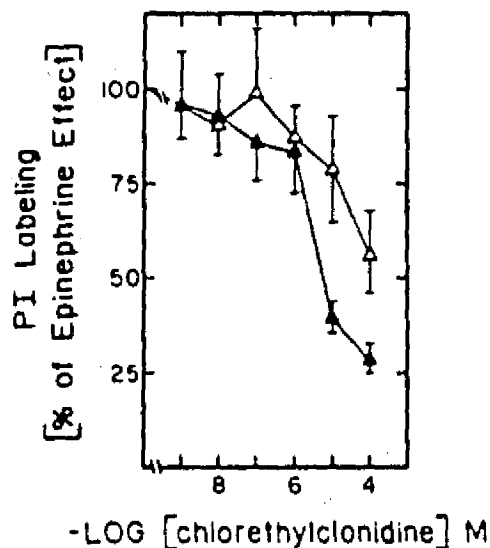


Fig. 3 Effect of chlorethylclonidine on the α_1 -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol labeling. Liver cells (▲) or rings of aorta (△) were preincubated for 15 min with different concentrations of chlorethylclonidine, washed and incubated in the presence of [32 P]Pi and $10 \mu\text{M}$ epinephrine. Results are expressed as percentage of the stimulation induced by epinephrine. Plotted are the means, and vertical lines represent the SE of 6-10 determinations using different preparations.

4101) contrasts with that in aorta (WB 4101 \geq 5-methyl urapidil = prazosin). These data suggest receptor subtypes and are consistent with those observed in other models (Morrow and Creese, 1986; Han et al., 1987; Hoyer et al., 1990) suggesting that liver cells mainly express α_{1B} -adrenoceptors, whereas aorta contains predominantly α_1 -adrenoceptors of the α_{1A} subtype.

The data with chlorethylclonidine are also in agreement with this interpretation. Chlorethylclonidine irreversibly inactivates only the α_{1B} -adrenoceptors (Han et al., 1987; Minneman, 1988). In our experiments with liver cells, 70-80% of the α_1 -adrenoceptors were blocked by chlorethylclonidine which clearly indicates the presence of a large proportion of α_{1B} -adrenoceptors in this tissue. In contrast, in aorta only 30-40% of the α_1 -adrenoceptors were inactivated by chlorethylclonidine and at relatively large concentrations. This is consistent with predominance of α_{1A} -adrenoceptors in this tissue. The possibility that chlorethylclonidine might have permeability difficulties in the aortic rings was considered. However, this does not seem to be the case. Tsujimoto et al. (1989) observed that even after five periods of treatment with chlorethylclonidine only a 31% loss of α_1 -adrenergic binding sites can be detected in aorta. Data from other authors are also consistent with our findings: Han et al. (1987) observed that treatment of purified membranes from liver with chlorethylclonidine inactivates \approx 80% of the [125 I]BE binding sites. Similarly, Tsujimoto et al. (1989) reported a 95% inactivation of the binding sites in rat hepatocytes. Using liver membranes Gross et al. (1988) observed that 5-MU competes with low affinity for the [3 H]prazosin binding sites.

Although our data clearly show that the adrenergic-mediated stimulations of PI labeling are mainly mediated by α_{1A} -adrenoceptors in aorta and α_{1B} -adrenoceptors in liver, they do not rule out the possibility of some heterogeneity. In fact, some data suggest this possibility, i.e., the partial inactivation by chlorethylclonidine, the shallowness of some of the inhibitory curves and some reports which also suggest such heterogeneity in these models. We and others (see Garcia-Sáinz, 1987 and references therein) have observed that in liver cells some of the α_1 -adrenergic effects suggest the possibility of receptor heterogeneity and/or additional signalling mechanisms. Similarly Tsujimoto et al. (1989) has shown that the small chlorethylclonidine-sensitive population of α_1 -adrenoceptors in aorta has some contribution in activating phosphorylase, and they suggested the possibility that receptor heterogeneity may exist in this tissue.

In summary, our data clearly show the existence of two pharmacologically distinct α_1 -adrenoceptors in liver and aorta. This probably explains the differences in activity observed previously with some agonists (Garcia-Sáinz et al., 1985; Tsujimoto et al., 1989).

Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from CONACYT (P228 CCOX85-1590) and The Program for Research Projects (UNAM-DGAPA IN 021889). The authors thank Ms Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript.

References

- Berridge, M.J. and R.F. Irvine, 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315.
- Berry, M.N. and D.S. Friend, 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 43, 506.
- Berthelsen S and W.A. Pettinger, 1977. A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. *Life Sci.* 21, 595.
- Bylund DB, 1988. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 356.
- Docherty, J., 1987. α_2 -Adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle: a premature proposal? *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 123.
- Fain, J.N. and J.A. Garcia-Sáinz, 1980. Role of phosphatidylinositol turnover in α_1 and of adenylate cyclase inhibition in α_2 effects of catecholamines. *Life Sci.* 26, 1183.
- Flavahan, N.A. and P.M. Vanhoutte, 1986. α_2 -adrenoceptor subclassification in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 347.
- García-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.
- García-Sáinz, J.A., R. Villalobos-Molina, S. Corvera, J. Huerta-Bahena, G. Tsujimoto and B.B. Hoffman, 1985. Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the α_1 -adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *European J. Pharmacol.* 112, 393.
- García-Sáinz, J.A., 1987. Pathways of the α_1 -adrenergic action. Comparison with V₁-vasopressin and A₁-angiotensin. *Circ. Res.* 61 (Suppl. II) 1.
- Gross, G., G. Hanft and C. Rugevics, 1988. 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the α_2 -adrenoceptor. *European J. Pharmacol.* 151, 333.
- Han, C., P.W. Abel and K.P. Minneman, 1987. Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chloroethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* 32, 505.
- Han, C., P.W. Abel and K.P. Minneman, 1988. α_1 -adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature* 329, 333.
- Hieble, J.P., R.M. DeMarrinis and W.D. Mathews, 1986. Evidence for and against heterogeneity of α_2 -adrenoceptors. *Life Sci.* 38, 3339.
- Hoyer, D., C.R. Jones, W. Ford and J.M. Palacios, 1990. Subtypes of α_1 -adrenoceptors in hippocampus of pigs, guinea-pigs, calves and humans: regional differences. *European J. Pharmacol.* 188, 9.
- Kobilka, B.K., H. Matsui, T.S. Kobilka, T.L. Yang-Feng, U. Francke, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and J.W. Regan, 1987. Cloning, sequencing and expression of the gene coding for the human platelet α_2 -adrenergic receptor. *Science* 238, 650.
- McGrath, J. and V. Wilson, 1988. α -Adrenoceptor subclassification by classical and response related methods: same question, different answers. *Trends Pharmacol. Sci.* 9, 162.
- Minneman, K.P., 1988. α_2 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* 40, 87.
- Morrow, A.L. and I. Creese, 1986. Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [³H]WB 4101 and [³H]prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* 29, 321.
- Regan, J.W., T.S. Kobilka, T.L. Yang-Feng, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and B.K. Kobilka, 1988. Cloning and expression of a human kidney cDNA for an α_2 -adrenergic receptor subtype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 6301.
- Stalmans, W. and H-G. Hess, 1975. The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride and sulfate. *European J. Biochem.* 54, 341.
- Tolbert, M.E.M., A.C. White, K. Aspry, J. Cuts and J.N. Fain, 1980. Stimulation by vasopressin and α -catecholamines of phosphatidylinositol formation in isolated rat liver parenchymal cells. *J. Biol. Chem.* 255, 1938.
- Tsujimoto, G., A. Tsujimoto, E. Suzuki, and K. Hashimoto, 1989. Glycogen phosphorylase activation by two different α_1 -adrenergic receptor subtypes. methoxamine selectively stimulates a putative α_1 -adrenergic receptor subtype (α_{1a}) that couples with Ca^{2+} influx. *Mol. Pharmacol.* 36, 166.
- Villalobos-Molina, R., M. Uc., E. Hong and J.A. Garcia-Sáinz, 1982. Correlation between phosphatidylinositol labeling and contraction in rabbit aorta. Effect of α_1 adrenergic activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 258.

Apéndice 2

La información contenida en este trabajo será adecuada al formato del Eur. J. of Pharmacol. para enviar a publicación.

Subtipo de adrenoceptor α -1 en adipocito blanco de rata
Torres-Márquez, M.E., Romero-Avila, M.T. y García-Sáinz, J.A.

Los receptores α -1 adrenérgicos fueron inicialmente subdivididos en 2 subtipos (α -1 y α -2), con base en sus afinidades para agonistas y antagonistas y en su mecanismo de transducción α -1 adrenérgico (Berthelsen y Pettinger, 1977; Fain y García-Sáinz, 1980).

Evidencias recientes utilizando herramientas de biología molecular han mostrado la existencia de tres subtipos α -2 adrenérgicos (Kobilka et al, 1987; Bylund, 1988; Regan et al, 1988) y tres subtipos α -1 adrenérgicos; α -1A, α -1B y α -1C (Cotecchia et al, 1988; Lomasney et al, 1991; Schwinn et al, 1990) y la evidencia farmacológica obtenida a la fecha ha sugerido la existencia de al menos los subtipos α -1A y α -1B (Morrow y Creese, 1986; Han et al, 1987; Gross et al, 1988). Los antagonistas más utilizados con estos fines son el 5 Metil-urapidil, 5 MU (Gross et al, 1988), la cloroetil-clonidina, CEC (Han et al, 1987; 1988) y el WB 4101 (Morrow y Creese, 1986).

Estudios previos en el laboratorio demostraron que la estimulación α -1 adrenérgica en el adipocito lleva al recambio de PI (García-Sáinz y Fain, 1980a; García-Sáinz, 1983). Por otro lado llama la atención que la respuesta α -1 adrenérgica sea relativamente sensible a la acción de la toxina pertussis (Moreno et al, 1983) y poco susceptible a la acción bloqueadora de los ésteres de forbol (García-Sáinz y Juárez-Ayala, 1988), a diferencia del hepatocito (García-Sáinz et al, 1986; 1990). Como se mostró previamente (Torres-Márquez et al, 1991), algunas diferencias en la respuesta α -1 adrenérgica pueden ser reflejo de la existencia de un subtipo de receptor diferente. De aquí que en este trabajo se pretende caracterizar el subtipo de adrenoceptor presente en las células del tejido adiposo blanco de rata.

Metodología

El recambio de PI se midió como se describió previamente por García-Sáinz y Fain (1980). Los experimentos de inhibición por los antagonistas se realizaron coincubando los compuestos a las concentraciones indicadas en presencia de epinefrina $10 \mu\text{M}$ mas $10 \mu\text{M}$ de propranolol. En el caso de la cloroetilclonidina, las células se preincubaron por 15 min con $100 \mu\text{M}$ de CEC, se lavaron y posteriormente se incubaron con la epinefrina a las concentraciones indicadas, en todos los casos se añadió

10 μ M de propranolol.

Los experimentos de enlazamiento con [125 I]HEAT se realizaron en preparaciones membranales obtenidas como se reportó por Mohell et al (1983). La curva de saturación del ligando radiactivo se realizó como lo reporta Lomasney et al (1991) utilizando 1 mg de proteína/tubo. Las curvas de desplazamiento fueron realizadas con 200 fM de ligando epinefrina y las concentraciones indicadas de antagonista o agonista según sea el caso.

Resultados

Estudios previos del laboratorio mostraron que la estimulación α -1 adrenérgica en el adipocito lleva al recambio de PI y éste fue uno de los parámetros utilizados en este trabajo para estudiar el subtipo de α -1 adrenoceptor involucrado en su respuesta. El otro enfoque utilizado fue el del enlazamiento del ligando [125 I] HEAT al receptor α -1 adrenérgico, como se ha empleado para tejidos con baja densidad del receptor (Bylund, 1987).

En la figura 1A se puede observar el típico patrón de la respuesta a epinefrina dependiente de la concentración del agonista. Se puede ver también que esta respuesta α -1 (Fig 1A) es antagonizada, por CEC, como corresponde a un adrenoceptor α -1 B o α -1C. Se realizó el bloqueo de la respuesta por los diferentes antagonistas α -1 adrenérgicos, no alquilantes (fig 1B), y se pudo observar que: la

respuesta es bloqueada en su totalidad por prazosina, como corresponde a un receptor α -1 adrenérgico. La respuesta es también bloqueada por el 5 M-U y el WB 4101 (Fig 1B). En donde el orden de potencia de los antagonistas para bloquear la respuesta fue: prazosina > 5 MU > a WB 4101, sugiriendo se trataba de un receptor α -1B

De los estudios de enlazamiento se pudo obtener una saturación con el ligando radiactivo, denotando una $K_d=125 \pm 18$ pM y una B_{max} de 8.9 ± 2 fmol/mg proteína (Fig 2A). Este compuesto fue desplazado por los diferentes antagonistas con un orden de potencia como sigue: prazosina > 5 MU > WB 4101 (Fig 2A). Se realizaron también las curvas de desplazamiento para agonista (fig 2C) donde se muestra un orden de potencia epinefrina > norepinefrina > fenilefrina. Estos datos concuerdan con los previamente obtenidos para el recambio de PI (García-Sáinz, 1983).

Los valores comparativos de las K_i s para los antagonistas obtenidas en los estudios de recambio de PI o de enlazamiento, así como las EC_{50} para agonistas se resumen en la Tabla 1. Se corrobora en esta tabla que el orden de potencia de los antagonistas para inhibir la respuesta corresponde a un subtipo de adrenoceptor α -1 B.

Discusión

Los datos presentes confirman la existencia de receptores α -1 adrenérgicos funcionales en el adipocito de

rata. La densidad de receptores obtenida en este trabajo es ligeramente menor a la que se reportó por Kabataki et al (1991) (8.9 ± 2 vs 24 ± 3.2 fmoles/mg de proteína) utilizando como ligando a la [^3H]bunazosina. No obstante la capacidad específica de este ligando es baja y sus resultados se están tratando de reproducir en nuestro laboratorio. Esta densidad es también menor en relación a la presente en el tejido adiposo humano (303 fmol/mg de prot) (Burns et al, 1981), en este caso el número de receptores fué determinado por enlazamiento con [^3H]WB 4101, lo que permite sugerir que el valor obtenido podría estar sobrestimado pues este ligando es capaz de enlazar también a algunos receptores α -2 adrenérgicos. La evidencia de la funcionalidad de éstos receptores α -1 adrenérgicos se ha observado también en la estimulación de la glucógeno sintetasa (Lawrence y Larnier, 1977; García-Sáinz y Fain, 1980b) y en el incremento de IP_3 en el tejido adiposo (Namberg y Putney, 1986). El subtipo de adrenoceptor identificado en éstas células fue α -1 B predominantemente, de acuerdo al orden de potencia obtenido para los antagonistas que fue: prazosina >5 MU $>$ WB4101. Este orden de potencia se pudo observar tanto en estudios de enlazamiento, como en los estudios funcionales de recambio de PI.

El antagonista CEC, también fue capaz de abolir la respuesta como corresponde a un adrenoceptor α -1 B. No obstante, se pudo observar una respuesta residual después

del tratamiento con este agente, lo cual sugiere que o bien, el compuesto no es capaz de bloquear totalmente la respuesta o existe un pequeño componente de adrenoceptores α -1 A. La incapacidad de la CEC para bloquear totalmente la respuesta α -1 B se ha observado por otros autores (Han et al, 1987) y se ha adjudicado al carácter altamente hidrofílico del compuesto, que no le permite el acceso a la totalidad de los receptores. El orden de potencia de los antagonistas para el bloqueo de la respuesta α -1 adrenérgica es el esperado para un adrenoceptor α -1B, la magnitud de éstas diferencias al menos en el recambio de PI no es tan grande como el que se puede observar en el hígado, típicamente α -1B. Sin embargo, los estudios de enlazamiento muestran una magnitud mayor para el orden de potencia. La última diferencia en la magnitud de los ordenes de potencia entre hígado y adipocito, puede estar más directamente relacionada con las características intrínsecas del adipocito, como su menor actividad metabólica, que permitiría un menor marcaje de las pozas de ^{32}P haciendo menos evidente las diferencias en el recambio de PI. En cuanto a la posibilidad de un componente α -1A en estas células no puede ser totalmente descartado.

Con los resultados obtenidos se puede decir que el adipocito presenta un receptor adrenérgico predominantemente α -1 B. Nuestros datos señalan también la importancia de estudiar los subtipos de adrenoceptores α -1 en los diferentes tejidos de los cuales provienen, pues se podría encontrar que dependiendo del entorno del receptor, éste

puede presentar algunas peculiaridades que posiblemente influyan en su regulación, no obstante el pertenecer a alguno de los subtipos identificados.

Bibliografía

- Burns, T.W., Langley, P.E., Bylund, D.B., Hoffman, B.B., Tharp, M.D., Lefkowitz, R.J., García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1981) J. Clin Inv. 67: 467-475.
- Bylund, D.B. (1988) TIPS 9: 356.
- Bylund, D.B. (1987) Biochemistry and Pharmacology of the α -1 adrenergic receptor. In: The α -1 adrenergic receptor (Ruffolo, R.R ed.) Humana Press N.J. pp. 19-70.
- Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. and Kobilka, B.K: (1988) Procc. Natl. Acad. Sci. 85: 7159-7163.
- Cheng, Y. and Prusoff, W.F (1973) Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108.
- Garcia-Sáinz, J.A. (1983) Eur. J. Pharmacol. 87: 159-161.
- García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1980a) Biochem. J. 186: 781-789.
- García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1980b) Mol. Pharmacol. 18: 72-77.
- García-Sáinz, J.A. and Juárez-Ayala, J. (1988) Eur. J. Pharmacol 146: 193-199.

- García-Sáinz, J.A., Macias-Silva, M., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Torres-Márquez, M.E., Trivedi, D., and Hruby, V.J., (1990) Cell. Signaling 2: 235-241.
- Gross, G., Hanft G. and Medorn, H.M. (1989) Eur. J. Pharmacol. 169: 325-328.
- Han Ch., Abel, P.W and Minneman, K.P. (1987) Mol. Pharmacol. 32: 505-510.
- Kobilka, B.K., Matsui, H. , Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Regan, J.W. (1987) Science 238: 650.
- Kobayashi, T., Watanabe, Y., Matsuura, Y., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kowamoto, T, Keno, Y., Tornø, S. and Yoshida, H. (1991) J. Lipid. Res. 32: 191-196.
- Lawrence, J.C. and Lerner, J. (1977) Mol. Pharmacol. 13: 1060-1065.
- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W-Y., Schwinn, D., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1991) J. Biol. Chem. 266: 6365-6369.
- Mohell, N., Svartengren, J. and Cannon, B. (1983) Eur. J. Pharmacol. 92: 15-25.
- Monson, P.J. and Rodbard, D. (1980) Anal. Biochem. 107: 220-239.
- Moreno, F.J., Mills, I., García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1983) J. Biol. Chem. 258: 10938-10943.
- Morrow, A.L. and Creese, I (1986) Mol. Pharmacol. 29:321.
- Nanberg, E. and Putney, J.W. Jr. (1986) FEBS Lett. 195: 319-322

- Regan T.W., Kobilka, T.S, Yang-Feng,T.L., Caron, M.G.,
Lefkowitz, R.J. and Kobilka, B.K. (1988) Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 85: 6301.

- Schwin, D.A., Lomasney, J.W., Lorenz, W., Szklut,P.J.,
Freneau, R.T., Yang-Feng,T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J.
and Cotecchia, S. (1990) J. Biol. Chem. 265: 8183-8189.

Tabla 1. Valores de KI obtenidos para los antagonistas y agonistas α -1 adrenérgicos en adipocitos de rata.

Antagonista	KI (enlazamiento*) (nM)	KI/Ka (Recambio de PI**) (nM)
Prazosina	0.45 \pm 0.19	1.26 \pm 0.33
5-MU	14.23 \pm 2.80	5.33 \pm 2.00
WB 4101	23.0 \pm 7.60	13.3 \pm 0.48
Agonista		EC ₅₀ nM
Epinefrina	547 \pm 147	1400 ***
Norepinefrina	963 \pm 231	1600 ***
Fenilefrina	1177 \pm 86	

* Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de los valores obtenidos de tres experimentos diferentes de enlazamiento con [¹²⁵I] HEAT, realizados como se describe en métodos. El cálculo de la KI se obtuvo por medio del programa LIGAND (Monson and Rudbard, 1980).

** Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de 3-7 experimentos de recambio de PI realizados, como se describe en métodos. El valor de la KI se obtuvo utilizando la fórmula de Cheng and Prusoff, (1973).

*** Valores obtenidos a partir de lo reportado por García-Sáinz (1983)

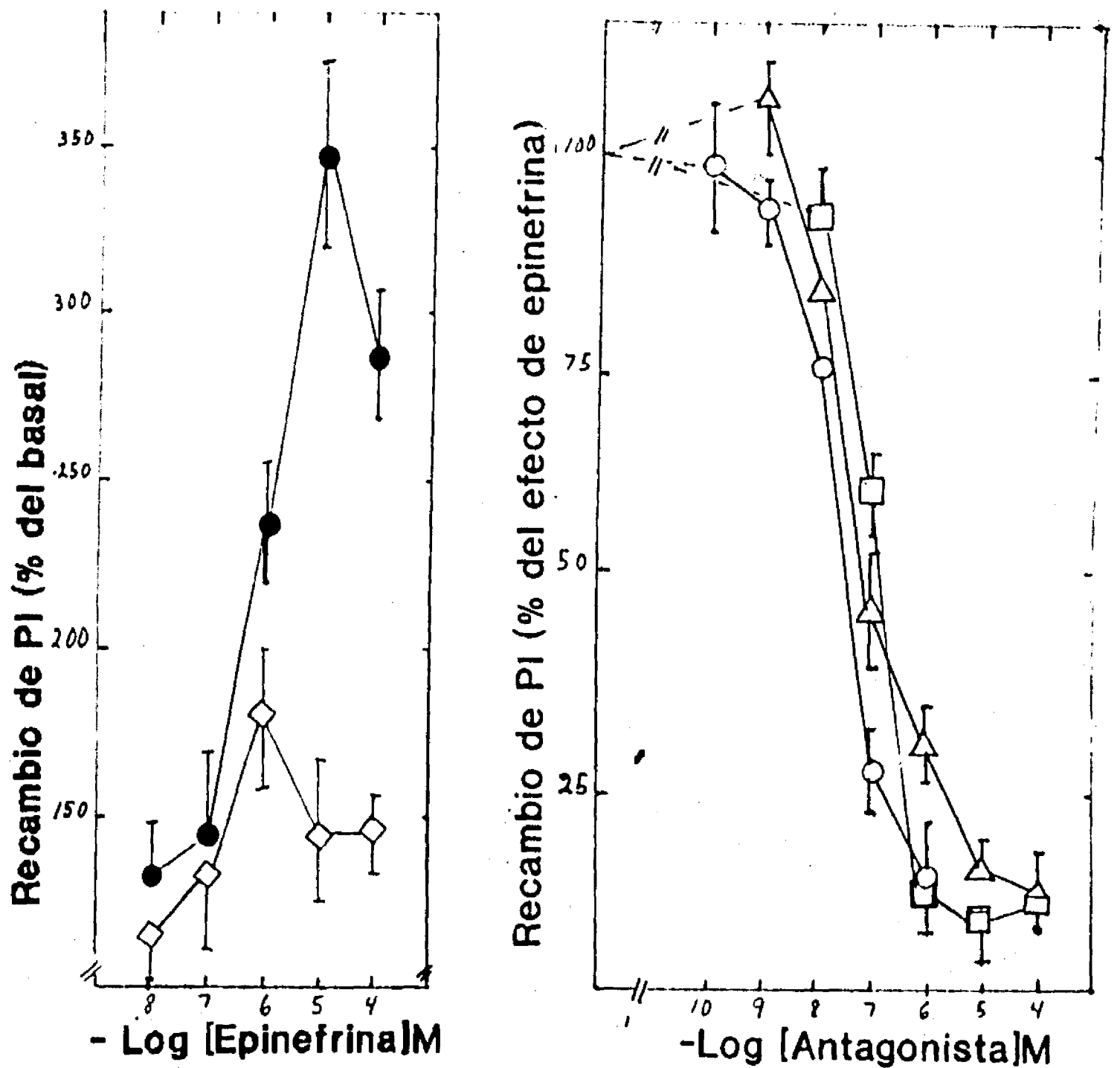


Figura 1. Respuesta α -1 adrenérgica en adipocitos de rata y su bloqueo por antagonistas α -1 adrenérgicos.

A) Recambio de PI estimulado por epinefrina en adipocitos control (●) y preincubados con CEC 100 μ M (◐).

La respuesta representa la $\bar{X} \pm SE$ de al menos 3 experimentos por realizados por triplicado.

B) Bloqueo del Recambio de PI estimulado por 10 μ M de epinefrina + 10 μ M de propranolol por los antagonistas prazosina (◻), 5 MU (◐) o WB 4101 (◑) a las concentraciones indicadas. Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de 3 experimentos realizados por triplicado en el caso del WB 4101 u ocho experimentos realizados por duplicado para los otros dos antagonistas.

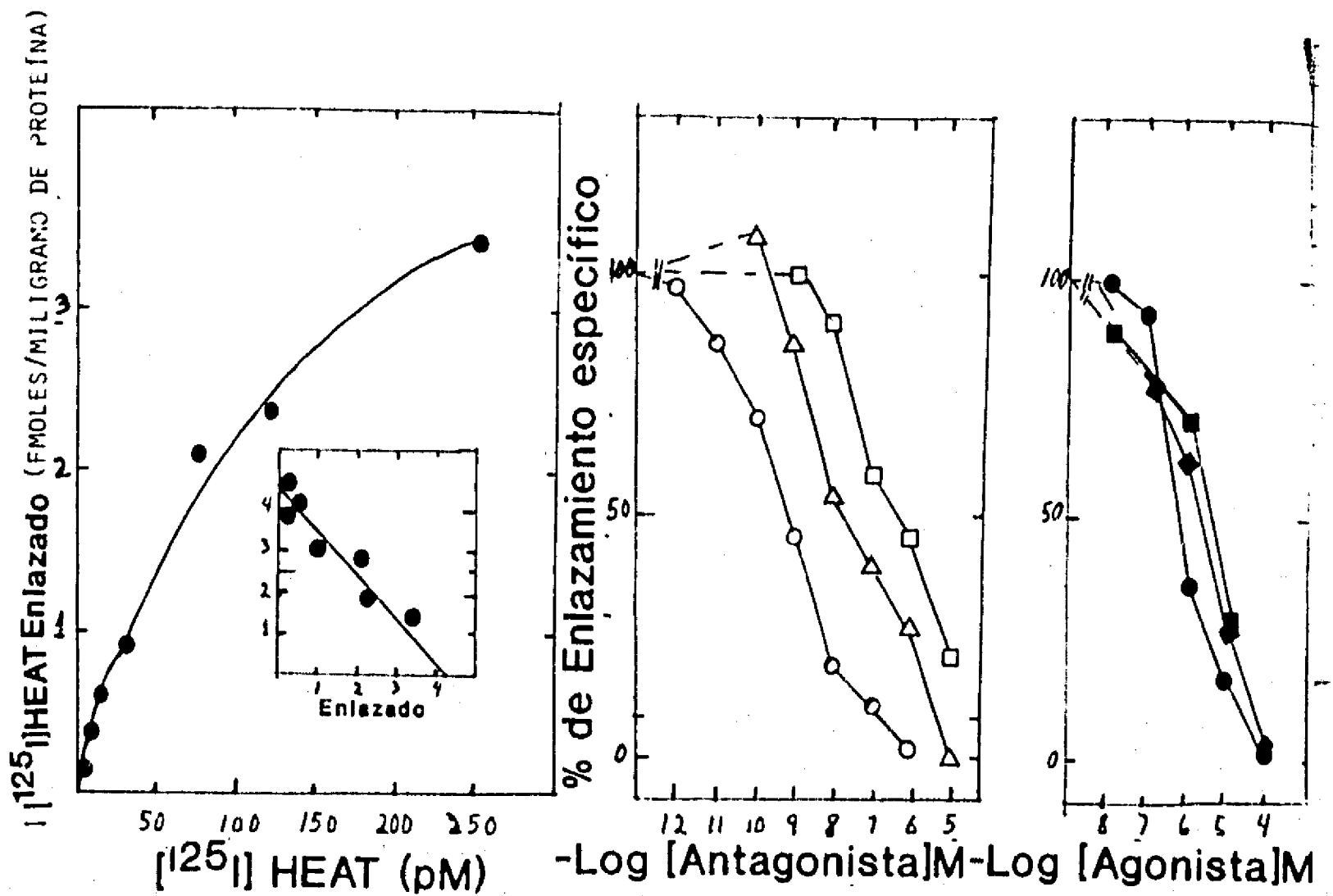


Figura 2. Curvas de Saturación para el $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ y su desplazamiento por antagonistas y agonistas α -1 adrenérgicos.

A) Curva de saturación representativa para el enlazamiento de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ en membranas de adipocito. En el inserto se muestra la curva de Hill donde se obtuvo una $K_d = 16 \text{ pM}$ y una B_{max} de 110 fmol/mg de proteína.

B) Grafica representativa del desplazamiento del ligando radiactivo en membranas de adipocito de rata por los antagonistas prazosina (\circ), 5 MU (\triangle) y WB 4101 (\square).

C) Grafica representativa del desplazamiento de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ por los agonistas epinefrina (\bullet), norepinefrina (\blacklozenge) y fenilefrina (\blacksquare).

Apéndice 3

Vol. 171, No. 2, 1990
September 14, 1990

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
Pages 618-624

CONTRASTING EFFECTS OF PHORBOL DIBUTYRATE AND PHORBOL MYRISTATE ACETATE IN RABBIT AORTA

Rafael Villalobos-Molina¹, Víctor Ransanz¹, M. Eugenia Torres-Márquez²,
Enrique Hong¹, and J. Adolfo García-Sáinz^{3*}

¹ Sección de Terapéutica Experimental, Depto. de Farmacología, CINVESTAV-IPN,
Mexico, D.F.

² Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Mexico, D.F.

³ Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Ap.
Postal 70-248, 04510 México, D.F.

Received July 17, 1990

In rat hepatocytes, active phorbol esters inhibited the α_1 -adrenergic stimulation of phosphatidylinositol labeling with the expected potency order: phorbol myristate acetate (PMA) > phorbol dibutyrate (PDB). In contrast, in rabbit aorta the α_1 -adrenergic action was inhibited dose-dependently by PDB but not by PMA. Similarly PDB (but not PMA) induced a strong contraction in rabbit aorta. The phorbol ester-induced contraction developed slowly, was dose-dependent and independent of extracellular calcium. These effects of PDB in rabbit aorta were neither inhibited by the protein kinase inhibitor H-7 nor mimicked by the synthetic diacylglycerol, OAG. Our results raise some doubts on the mechanism(s) through which the actions of PDB take place in rabbit aorta.

© 1990 Academic Press, Inc.

Phorbol esters are a series of tumor promoters that elicit a large variety of biological responses. Such effects seem to be initiated by the activation of protein kinase C (PKC) (1). This protein kinase plays a key role in processes of signal transduction (2-4) and it is a modulator of cell responsiveness (2,3). Phorbol myristate acetate (PMA) is the most potent and active of these protein kinase C activators and has become the prototype of this family of tumor promoters.

One of the effects of PMA is to block the α_1 -adrenergic action; this effect was first shown by us in liver cells (5-7) as has now been observed in other models such as rat aorta (8,9), hippocampal cells (10), vascular smooth muscle cells (11) and a vas deferens derived cell line (DDT, MF₂) (12). This

*To whom correspondence should be addressed.

0006-291X/90 \$1.50
Copyright © 1990 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

action of phorbol esters is associated to receptor phosphorylation (12) and seems to be part of a physiological feed back mechanism (13).

To our surprise in rabbit aorta PMA is essentially unable to block the α_1 -adrenergic-mediated stimulation of phosphatidylinositol (PI) labeling (14). Similarly, it was observed that PMA is unable to block the contraction induced by epinephrine (α_1 -adrenergic action) and induces only a very weak contraction per se in rabbit aorta (8). In contrast, PMA induces both a strong contraction and blocks the α_1 -adrenergic action in rat aorta (8). Nevertheless during the last years, several reports indicate that a different phorbol derivative, phorbol dibutyrate (PDB), induces strong contraction in rabbit aorta (15-18). We studied the effect of different phorbol derivatives, a synthetic diacylglycerol and an inhibitor of PKC on PI labeling and contraction and the results are presented here.

MATERIALS AND METHODS

4- α -Phorbol, PMA, PDB, 4-O-methyl ester phorbol (4-O-me-PMA), 1-oleoyl-2-acetylglycerol (OAG), 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7), and (-)-epinephrine were obtained from Sigma Chemical Co. [32 P]PI (carrier free) was from New England Nuclear.

The methods employed to study the α_1 -adrenergic stimulation of phosphatidyl inositol (PI) labeling in hepatocytes and aorta have been reported previously (14,19). In brief, isolated hepatocytes or rings of rabbit aorta were incubated in buffer containing 10 μ Ci/ml [32 P]PI. After a 60 min incubation, lipids were extracted with chloroform: methanol (2:1); the single phase was broken, the chloroform layer was evaporated and phospholipids separated by thin layer chromatography. Incorporation of label was counted in silica gel scrappings.

For contraction (19) aortic rings were connected to force transducers (FT 03 Grass); changes in isometric tension were recorded continuously on a 7P Grass polygraph. Four grams of passive tension were initially applied and the tissues were allowed to equilibrate for 120 min. The tissue was repeatedly contracted with 0.1 μ M epinephrine until the contractions became reproducible.

RESULTS

Epinephrine induces a marked stimulation of PI labeling in both rat hepatocytes and rabbit aorta (Fig. 1, panels A and C); this effect is mediated through α_1 -adrenoceptors (5-7, 14, 19). In hepatocytes, phorbol esters inhibit dose-dependently the α_1 -adrenergic action with the expected potency order PMA > PDB; α -phorbol and 4-O-me-PMA only weakly inhibit the α_1 -action at very high concentrations (Fig. 1, panel B). In marked contrast are the data

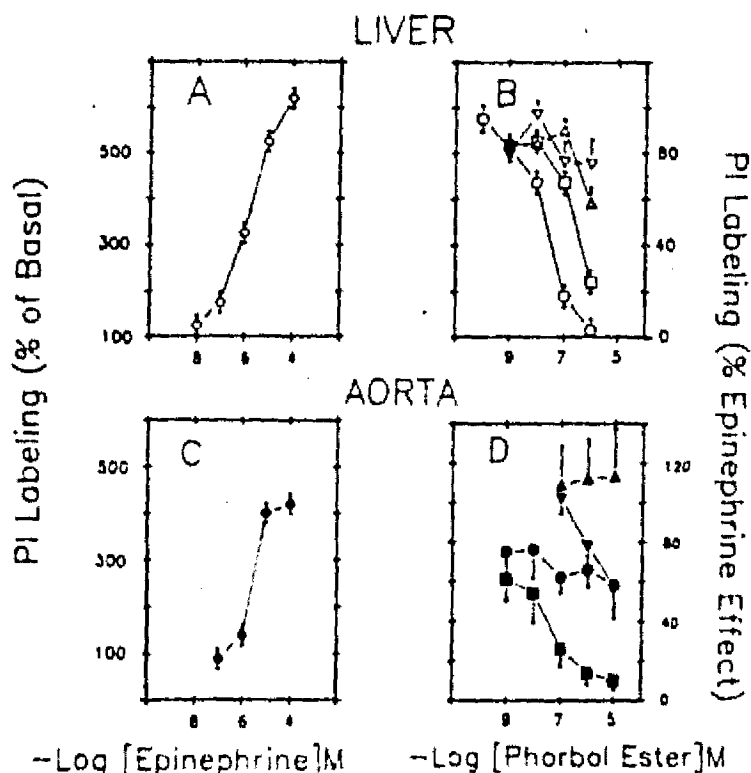


Figure 1. EFFECT OF EPINEPHRINE AND PHORBOL ESTERS ON PHOSPHATIDYLINOSITOL LABELING IN ISOLATED RAT HEPATOCYTES AND RABBIT AORTA. Hepatocytes (panels A and B) or rings of aorta (panels C and D) were incubated in the presence of different concentrations of epinephrine (panels A and C) or with 10 μ M epinephrine and different concentrations of the following phorbol esters (panels B and D); PMA (O, ●); PDB (□, ■); α -phorbol (\triangle , \blacktriangle) or 4-O-me-PMA (∇ , \blacktriangledown). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-8 experiments using different preparations.

obtained in rabbit aorta: PDB dose-dependently inhibits the α_1 -adrenergic effect; however, in agreement with our previous data (14), PMA only weakly diminished the effect and no dose-dependency was observed; α -phorbol had a very small inhibitory effect at high concentrations and 4-O-me-PMA has no effect at all (Fig. 1, panel D). The diacylglycerol derivative, OAG, blocked the α_1 -adrenergic effect in liver cells (not shown, see 20) but it was completely unable to do it so in rabbit aorta (not shown). Similarly H-7 which partially inhibits the blockade of the α_1 -adrenergic action induced by PMA in hepatocytes (21) was unable to shift the inhibitory dose-response curve to PDB in rabbit aorta even at a concentration as high as 0.1 mM (data not shown).

We next examined the effect of different phorbol esters on aorta contraction. PDB induced a dose-dependent contraction of large magnitude and

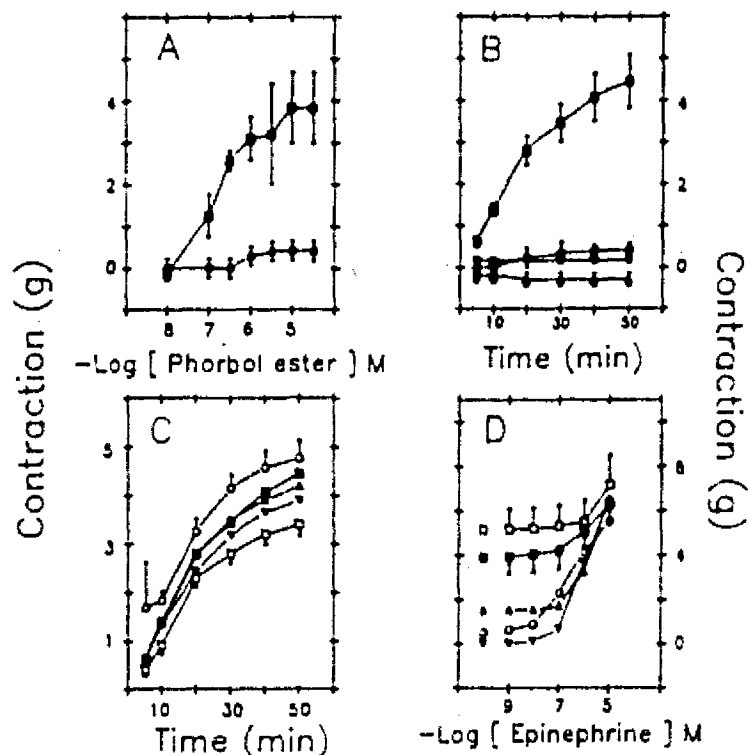


Figure 2. EFFECT OF PHORBOL ESTERS ON AORTA CONTRACTION. Panel A: Tissue was incubated with different concentrations of PMA (O) or PDB (■) for 30 min. Panel B: tissue was incubated for the times indicated with 1 μ M PDB (●), 10 μ M PMA (○), 10 μ M α -phorbol (▽) or 100 μ M 4-O-me-PMA (Δ). Panel C: tissue was incubated with 1 μ M PDB in buffer with the following calcium concentrations: 0 calcium plus 2.0 mM EGTA (o); 1.25 mM CaCl_2 (■); 2.5 mM CaCl_2 (Δ); 5 mM CaCl_2 (▽); 10 mM CaCl_2 (□). Panel D: tissue was incubated for 30 min with the following concentrations of PDB and then different concentrations of epinephrine were added: No PDB (O); 10 nM PDB (□); 0.1 μ M PDB (Δ); 1 μ M PDB (■); 10 μ M PDB (▽). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 4-6 determinations using different preparations; in Figure D some of the vertical lines were omitted for clarity, the S.E.M. were \approx 5-10% of the means.

slow onset (Fig. 2, panels A and B). Both features, the slow time-course and the dose-response curve are similar to that obtained by other authors (14-18). PMA induced a very small contraction and only at the highest concentration tested (10 μ M) (Fig. 2, panels A and B) while α -phorbol, 4-O-me-PMA and OAG were completely inactive (Fig. 2, panel B).

The contraction induced by PDB was independent of extracellular calcium; in fact, the effect of PDB was slightly larger as the concentration of calcium was decreased (Fig. 2, panel C).

Incubation with different concentrations of PDB for 30 min induced contraction by itself (Fig. 2); under these conditions, at low concentrations

of PDB the dose-response curve to epinephrine was slightly shifted to the right and at higher concentrations little further contraction was induced by the adrenergic amine (Fig. 2, panel D). However, the maximal contraction in all cases was almost identical (Fig. 2, panel D).

DISCUSSION

Our present results show remarkable differences in sensitivity to phorbol esters between rat hepatocytes and rabbit aorta. The potency order of the phorbol derivatives observed in rat liver is in accord with that for activation of PKC (1). However, the data obtained using rabbit aorta is not. The weak effect of PMA (prototype of these agents), the absence of action of OAG, together with the lack of inhibition by H-7 raises serious doubts on the underlying mechanism(s) of the effects of PDB in rabbit aorta. It is noteworthy that although PDB blocked both the α_1 -adrenergic mediated stimulation of PI labeling and induced aortic contraction the dose-response curves showed some difference in sensitivity ($IC_{50} \approx 20$ nM for the inhibition of the α_1 -adrenergic action and $EC_{50} \approx 200$ nM for contraction). The reason for such difference is currently unknown.

Other authors have observed that PDB induces aortic contraction in this model (15-18); the effect has been attributed to PKC activation. We can not rule out the possibility that PKC may participate in these effects. However, our data clearly indicate that the expected potency profile for phorbol esters is not observed and therefore caution should be exercised in interpreting these data.

PKC activity is not particularly abundant in aorta (22,23). However, in cultured rabbit aortic smooth muscle cells type III PKC isozyme has been detected by immunoblot analysis with specific monoclonal antibodies (24). However, PMA has clear effect on DNA synthesis and phospholipase-C mediated hydrolysis of phosphoinositides in these cells (24).

It has been previously observed that PMA can induce contraction in rabbit aorta (25). However, this effect of PMA was observed at high concentrations, was of small magnitude, took 3 to 4 hours to reach a maximum and it is calcium-

dependent (25). The role of extracellular calcium has been studied by several groups, some authors observed a partial requirement for the effect of PDB whereas we and Sybart et al (16) observed no such requirement for calcium. In other contractile models extracellular calcium seems to be required for the induction of contraction by phorbol esters (8,26,27). The reason for these differences is unknown. However, it raises the possibility that part of the effect of PDB could involve PKC activation but that another action(s) of this tumor promoter may contribute to it.

In summary, our results clearly show that PDB inhibits the alpha₁-adrenergic stimulation of PI labeling and induces contraction in rabbit aorta. They also show that PMA, the prototype phorbol ester, was surprisingly much less active.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was partially supported by Grants from CONACyT (P228CCOX89-1590), DGAPA (IN021889) and COSNET-SEP (PEP-18.89). The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for skillfully typing the manuscript.

REFERENCES

1. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
2. Nishizuka, Y. (1984) *Science* 223, 1365-1370.
3. Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312.
4. Exton, J. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 1-4.
5. Corvera, S. and Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133.
6. Garcia-Sáinz, J.A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277-280.
7. Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham R.M. and Garcia-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526.
8. Danthuluri, N.R., and Deth, R.C. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125, 1103-1109.
9. McMillan, M., Chernow, B. and Roth, B.L. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134, 970-974.
10. Labarca, R., Janowsky, A., Patel, J. and Paul, S.M. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 703-709.
11. Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L.M.F., Hagen, P.O., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1985) *Life Sciences* 37, 2389-2398.
12. Leeb-Lundberg, L.M.F., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5651-5655.
13. Garcia-Sáinz, J.A. (1987) *Circ. Res.* 61 (suppl II) 1-5.
14. Garcia-Sáinz, J.A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Tsujimoto, G. and Hoffman, B.B. (1985) *Eur. J. Pharmacol* 112, 393-397.
15. Gleason, M.M. and Flaim, S.F. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 1362-1369.

16. Sybertz, E.J., Desiderio, D.M., Tetzloff, G. and Chiu, P.J.S. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 78-83.
17. Singer, H.A. and Baker, K.M. (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243, 814-821.
18. Singer, H.A. (1989) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 1068-1074.
19. Villalobos-Molina, R., Uc, M., Hong, E. and A. García-Sáinz, J.A. (1982) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222, 258-261.
20. Cooper, R.H., Coll, K.E. and Williamson, J.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3281-3288.
21. García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 417-421.
22. Kuo, J.F., Andersson, R.G.G., Wise, B.C., Makerlova, L., Salomonsson, I., Brackett, N.L., Katoh, N., Shoji, M., and Wrenn, R.W. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 7039-7043.
23. Kuo, J.F., Schatzman, R.C., Turner, R.S. and Mazzei, G.J. (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.* 35, 65-73.
24. Kariya, K.I., Kawahara, Y., Fukuzaki, H., Hagiwara, M., Hidaka, H., Fukumoto, Y., and Takai, Y. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 1020-1027.
25. Khalil, R.A. and van Breemen, C. (1987) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244, 537-542.
26. Forder, J., Scriabine, A., and Rasmussen, H. (1985) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235, 267-273.
27. Miller, J.R., Hawkins, D.J. and Wells, J.N. (1986) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239, 38-42.

Apéndice 4 y complemento

El trabajo fué enviado a publicación al Biochem. Biophys. Acta
"MODULATION BY PROTEIN KINASE C OF THE HORMONAL RESPONSIVENESS
OF HEPATOCYTES FROM LEAN (Fa/fa?) AND OBESE (fa/fa) ZUCKER RATS".

J. Adolfo Garcia-Sainz^a, Rocio Alcantara-Hernandez^a, Martha
Robles-Flores^a, Ma. Eugenia Torres-Marquez^{a, b}, Duna Massillon^c,
Borhane Annabi^c and Gerald van de Werve^{c, d}.

^a Departamento de Bioenergetica, Instituto de Fisiologia
Celular, Universidad Nacional Autonoma de Mexico; Apartado
Postal 70-248, 04510 Mexico D. F.

^b Departamento de Bioquimica, Instituto Nacional de Cardiologia,
Juan Badiano 1, Mexico D. F.

^c Department of Biochemistry and

^d Department of Nutrition, Laboratoire d'Endocrinologie
Metabolique, Faculty of Medicine, University of Montreal,
Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Key words: Obese zucker rats,

α_1 -adrenergic.

Protein kinase C.

Cyclic AMP accumulation.

Correspondence should be sent to:

J. Adolfo Garcia-Sainz,
Inst. Fisiol. Celular, UNAM
Ap. Postal 70-248
04510 Mexico D. F.
Tel: (525) 550 5894
FAX: (525) 548 0387

SUMMARY

The effect of phorbol myristate acetate (PMA) on the hormonal responsiveness of hepatocytes from lean and obese Zucker rats was studied. Phenylephrine-stimulated phosphatidylinositol labeling and phosphorylase activation were antagonized by PMA in cells from obese and lean animals; bigger residual effects were observed in cells from obese animals even at high PMA concentrations. Cyclic AMP accumulation induced by isoproterenol, glucagon, forskolin and cholera toxin was higher in cells from lean animals than in those from obese rats. PMA diminished glucagon- and cholera toxin-induced cyclic AMP accumulation; cells from lean animals were more sensitive to PMA. Two groups of isoforms of protein kinase C (PKC) were observed in hepatocytes from Zucker rats using DEAE-cellulose column chromatography: PKC 1 and PKC 2. The PKC 1 isozymes were separated into four peaks using hydroxylapatite: aa, la (PKC- β), lb (PKC- α) and lc. Short treatment with PMA decreased the activity of PKC 1 (peaks lb (PKC- α) and lc) and to a lesser extent of PKC 2; cells from lean animals were more sensitive to PMA than those obtained from obese rats.

Our results indicate that cells from genetically obese Zucker rats are in general less sensitive to this activator of protein kinase C than those from their lean littermates. The possibility that alterations in the phosphorylation /dephosphorylation cycles, that control metabolism and hormonal responsiveness, may contribute to this obese state is suggested.

INTRODUCTION

Protein kinase C (PKC), a major component of transmembrane signalling systems, is encoded by a multigene family comprising at least seven forms with subtle differences in enzymological behavior [1]. In addition to its roles in metabolism, secretion and contraction [2], PKC modulates the cellular responsiveness to hormones by participating in regulatory feedback loops and in the cross-talk between different signal transduction systems [2-4]. Among its substrates are receptors, G-proteins and membrane effectors [3,4]. PKC is activated physiologically by the second messenger diacylglycerol and pharmacologically by active phorbol esters such as phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) [2].

In rat liver cells, activation of PKC by PMA leads, among other effects, to inactivation of glycogen synthase [5], blockade of α_1 -adrenergic actions [6-10], heterologous desensitization of adenylate cyclase via inhibition of G_s activity [11-15], blockade of G_i function (inhibition of adenylate cyclase by low concentrations of Gpp(NH)p) via phosphorylation of α_{Gi-2} [16] and a rapid loss of PKC activity [17].

Mature genetically obese (fa/fa) Zucker rats exhibit insulin resistance which is expressed in several tissues such as muscle, adipose tissue and liver [18] and it is associated to a deficient action of PKC [19,20]. In liver cells from obese animals the properties of PMA to counteract phenylephrine-mediated activation of phosphorylase and to inactivate glycogen synthase are attenuated [20]. We further characterized this phenomenon by studying several of the known actions of PKC in hepatocytes; our

results show a decreased sensitivity to PMA in liver cells from obese (fa/fa) animals.

MATERIALS AND METHODS

Lean (Fa/fa?) and obese (fa/fa) Zucker rats were purchased from Charles River (USA or Canada). Animals were 10-20 weeks old at the time of the experiment. Hepatocytes were isolated and incubated as previously described [12,20]. Glycogen phosphorylase activity was assayed at 30°C in homogenates of thawed cell suspensions as described by Hue et al [21]. Labelling of phosphatidylinositol (PI) with [³²P]Pi was carried out as described previously [7]. Cyclic AMP was determined in cells plus medium by the method of Brown et al [22]; in these experiments the cells were incubated for 2 min with the agents and in the presence of 0.1 mM methyl isobutyl xanthine (MIX) to inhibit phosphodiesterase activity.

PKC activity was assayed by measuring the incorporation of ³²P from [γ -³²P]ATP into HI-111S histone [17]; the procedures for homogenization, DEAE-cellulose and hydroxyapatite column chromatography, SDS-PAGE and immunoblotting were performed as previously described in detail [17].

RESULTS

Phenylephrine (in the presence of 10 μ M propranolol) activated glycogen phosphorylase in hepatocytes from obese and lean rats (Table 1). PMA almost completely antagonized in dose-dependent fashion this effect of the catecholamine in cells from lean animals but a big residual action of the agonist was

observed even in the presence of micromolar concentrations of the active phorbol ester in cells from obese rats (Fig. 1, left panel) [20]. Similarly, 10 μ M phenylephrine (in the presence of 10 μ M propranolol) increased the labeling of PI both in cells from lean or obese animals: (180 \pm 30 and 220 \pm 10% of basal labeling, respectively; means \pm S.E.M., n = 5 and 6 respectively). Prazosin 1 μ M blocked this action of the catecholamine evidencing the involvement of α_1 -adrenoceptors (results not shown). PMA antagonized the effect of phenylephrine in cells from obese or lean animals (Fig. 1, right panel); the dose-response curves were not very different although at 1 μ M PMA a consistently higher residual effect of the agonist was observed in cells from obese rats (Fig. 1, right panel).

Isoproterenol activated phosphorylase and increased cyclic AMP accumulation in cells from lean rats (Table 1 and Fig. 2). We were unable to detect any clear increase in cyclic AMP accumulation in response to isoproterenol in cells from obese animals (Fig. 2); however, the beta-adrenergic agonist stimulated glycogen phosphorylase α activity (Table 1).

Glucagon activated phosphorylase (Table 1) and provoked cyclic AMP accumulation. Interestingly, although the activation of phosphorylase was comparable the accumulation of cyclic AMP induced by glucagon was consistently decreased in hepatocytes from obese rats as compared to cells from lean animals (Fig. 3). The effects of forskolin (Fig. 4) and cholera toxin on cyclic AMP accumulation (Fig. 5) were also decreased in cells from obese rats. PMA decreased the accumulation of cyclic AMP induced by

cholera toxin or glucagon in hepatocytes from both, obese and lean rats; however, the decreases were observed at lower PMA concentrations and were also more important in cells from lean animals than in those from obese ones (Fig. 6). The effect of forskolin was not altered by PMA (data not shown) in agreement with our previous findings [14,15].

Two main groups of PKC isozymes have been detected in Wistar rat hepatocytes using DEAE-cellulose: PKC 1 and PKC 2 [17]. In whole cell extracts obtained from hepatocytes from Zucker rats, these two groups of PKC isozymes were also present (results not shown): the absolute values of PKC 1 and PKC 2 activity were somewhat variable from animal to animal but in general were similar in cells from obese or lean rats for PKC 1 and slightly higher (approx. 2-fold) in the cells from obese rats for PKC 2 (Fig. 8, figure legend).

In hepatocytes from Wistar rats, PMA induces a rapid loss of activity of PKC 1 and a smaller loss of PKC 2 [17]. We confirmed this finding using liver cells from Zucker rats and further observed that cells from lean rats were more sensitive to PMA than hepatocytes from obese animals (Fig. 7).

In cells from Wistar the isozymes in the PKC 1 peak can be resolved using hydroxyapatite column chromatography into three peaks 1a, 1b and 1c; we identified peak 1a as PKC- β and peak 1b as PKC- α [17]. Treatment with PMA provoked a loss of activity of peaks 1b (PKC- α) and 1c whereas peak 1a (PKC- β) activity was not affected [17]. PKC 1 of hepatocytes obtained from Zucker rats can be separated into four peaks using hydroxyapatite column chromatography: peaks 1a, 1b and 1c (those previously observed

in cells from Wistar rats [17]) and another small peak that we have named aa (Fig. 8). This pattern was very similar in cells obtained from obese and lean rats (Fig. 8). We attempted to determine if the decrease in PKC 1 sensitivity could be associated to specific isoforms. For this purpose cells were incubated in the absence or presence of 10 nM PMA (a concentration at which the difference in sensitivity between cells from obese and lean animals is marked; see Fig. 8). In cells from lean rats PMA induced marked decreases in the activity of peaks lb (44 ± 4 % of the activity in the absence of PMA) and lc (48 ± 4 % of the activity in the absence of PMA) but no change was observed in peaks laa or la (105 ± 10 and 126 ± 11 % of the activities in the absence of PMA, respectively) (Fig. 8). In cells from obese rats 10 nM PMA failed to significantly decrease the activity of any of the PKC 1 peaks (aa, 105 ± 11 ; la, 109 ± 20 ; lb, 90 ± 2 and lc, 95 ± 2 % of the activities observed in the absence of PMA; results are the means \pm S.E.M. of three experiments in triplicate using different cell preparations) (Fig. 8). Using isoform-specific monoclonal antibodies we performed immunoblots of the isoforms; peak la was identified as PKC- β and peak lb as PKC- α (Fig. 9), in agreement with our previous data [17]; peaks aa and lc were not recognized by these antibodies (Fig. 9) [17].

DISCUSSION

The role of PKC in modulating cell responsiveness to extracellular stimuli has received considerable attention [2-4]. However, the precise biochemical mechanism(s) which lead to such

modulations are only known in very few cases. The study is complicated by the fact that PKC might have action(s) at different levels on the signal transduction processes and also on the cascade of intracellular events that lead to the final effects [2-4]. Further complexity arises from the fact that several isoforms of PKC can be present in a single cell type [1].

In the present study we examined obese (fa/fa) Zucker rats in comparison with lean (Fa/fa?) animals. The genetic lesion responsible for the obese condition is unknown, but in association with insulin resistance, a defect in PKC activation has been suggested [19,20].

Van de Werve and Massillon [20] observed previously that PMA blocked the activation of phosphorylase by phenylephrine in cells from lean animals, but only partially did so, in hepatocytes from obese rats [20]. The possibility that beta-adrenoceptors could be responsible for the partial blockade of phenylephrine action by PMA was considered. This was specially important since it is known that the obese Zucker rats suffer from hypothyroidism [23] and hepatocytes from hypothyroid rats usually have an increased beta-adrenergic responsiveness [24-26]. However, the results ruled out this possibility. Inclusion of 10 μ M propranolol to block beta-adrenoceptors did not modify the effect of PMA on the activation of phosphorylase α by phenylephrine (Fig. 1). Furthermore, in the studies on alpha₁-adrenergic stimulation of PI labeling in cells from obese rats we also observed a residual adrenergic action, in spite of the presence of relatively large concentrations of PMA (Fig. 1). However, this residual effect was

not as dramatic as in the metabolic studies. It is well known that only a small increase in IP_3 is required to maximally increase cytosol Ca^{2+} [27]. Therefore, it is possible that a small residual second messenger generation could be sufficient to elicit a large metabolic response. A similar situation may explain the paradoxical lack of correlation between cyclic AMP accumulation and phosphorylase α activation by isoproterenol and glucagon.

Cells from obese animals had a decreased cyclic AMP accumulation to agents that activate adenylate cyclase such as isoproterenol, glucagon, forskolin and cholera toxin (Figs. 2-5); our data indicate a general post-receptor defect but do not allow us to distinguish if it involves G_s , the catalytic subunit or both. Previously, Houslay and coworkers [28] studied this matter and suggested that abnormalities in the level of expression of the 52 KDa forms of the alpha subunit of G_s give rise to an altered coupling between receptors and adenylate cyclase in liver membranes from obese Zucker rats.

In our present study and in that of Houslay et al [28] a decreased production of cyclic AMP in response to glucagon was shown in obese rats. However, while we recognized a decrease in maximal effect, these authors observed a decrease in the K_a in basal conditions [28]. Interestingly, they [28] also reported that treatment with pertussis toxin magnified the effect of glucagon in membranes from lean animals but not in those from obese ones; data similar to those we obtained. Later studies by this group [16] elegantly showed that this difference is due to the activities and basal states of phosphorylation of alpha-Gi-2

in liver membranes from obese and lean rats. It should be mentioned that in our studies we measured cyclic AMP accumulation in whole cells whereas Houslay et al [28] assayed adenylate cyclase activity in isolated membranes. Therefore, it is possible that a different participation of Gi under these conditions could explain the difference observed.

In the present study, using hepatocytes from Zucker rats, we confirm: a) the ability of PMA to decrease glucagon- and cholera toxin-stimulated cyclic AMP accumulation [11-15]; b) the rapid PMA-induced decrease in PKC 1 activity due to diminution in activity of some PKC isozymes, i.e., peaks 1b (PKC- α) and 1c, as was previously reported in cells from Wistar rats [17].

It is important to mention here that in hepatocytes from obese Zucker rats there is evidence for changes in the activity of a protein phosphatase (glycogen synthase phosphatase) [29,30]. Phosphorylation/dephosphorylation cycles are among the most powerful biochemical mechanisms that control cellular functions [31] and the state of phosphorylation of a given protein depends on the balance of the two activities (kinases/phosphatases).

From the present results it is clear that the decrease in sensitivity to PMA in liver cells from obese animals is a rather generalized phenomenon and not the result of a defect in one specific isozyme. The possibility that such decreased sensitivity to PMA could be due to a change in the primary structure of PKC is highly unlikely since the isozymes are coded by different genes [1]. Therefore, secondary action(s) on various factors, including among others, covalent modification of PKC, presence of

inhibitors, differences in the PKC substrates in permeability to PMA, in the availability of cofactors or even in the activity of some phosphatases could explain the decreased sensitivity to this tumor promoter found in hepatocytes obtained from obese animals.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ms. Guadalupe Ramirez for typing the manuscript. This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN201889) and CONACYT to J.A.G.-S. and by Grant MT 10804 from the Medical Research Council of Canada to G. v.d.W.

REFERENCES

- 1 Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334, 661-665
- 2 Nishizuka, Y. (1986) *Science* 233, 305-312
- 3 Houslay, M.D. (1991) *Eur. J. Biochem.* 195, 9-27
- 4 Garcia-Sáinz, J.A. (1991) *News Physiol. Sci.* 6, 169-173
- 5 Roach, P.J. and Goldman, M. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7170-7172
- 6 Corvera, S. and Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119, 1128-1133
- 7 Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and Garcia-Sáinz, J.A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 520-526
- 8 Cooper, R.H., Coll, K.E. and Williamson, J.R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 3281-3288
- 9 Lynch, C.J., Charest, R., Bocchino, S.B., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 2844-2851
- 10 Van de Werve, G., Proietto, J. and Jeanrenaud, B. (1985) *Biochem. J.* 231, 511-516
- 11 Heyworth, C.M., Whetton, A.D., Kinsella, A.R. and Houslay, M.D. (1984) *FEBS Lett.* 170, 38-42
- 12 Garcia-Sáinz, J.A., Mendlovic, F. and Martínez-Olmedo, M.A. (1985) *Biochem. J.* 228, 277-280
- 13 García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163, 417-421
- 14 Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macías-Silva, M., Plebański, M. and Garcia-Sáinz, J.A. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 972, 311-319
- 15 Hernández-Sotomayor, S.M.T., Macías-Silva, M., Malbon, C.C. and Garcia-Sáinz, J.A. (1991) *Am. J. Physiol.* 260, C259-C265
- 16 Bushfield, M., Pyne, N.J. and Houslay, M.D. (1990) *Eur. J. Biochem.* 192, 537-542
- 17 Robles-Flores, M., Alcántara-Hernández, R. and Garcia-Sáinz, J.A. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* (in press)
- 18 Jeanrenaud, B., Halimi, S. and van de Werve, G. (1985) *Diabetes Metab. Rev.* 1, 261-291
- 19 Van de Werve, G., Zaninetti, D., Lang, U., Vallotton, M.B. and Jeanrenaud, B. (1987) *Diabetes* 36, 310-314

- 20 Van de Werve, G., and Massillon, D. (1990) *Biochem. J.* 269, 795-799
- 21 Hue, L., Bontemps, F. and Hers, H.G. (1975) *Biochem. J.* 152, 105-114
- 22 Brown, B.L., Albano, J.D.M., Ekins, P. and Sgherzi, A.M. (1971) *Biochem. J.* 121, 561-562
- 23 Bray, G.A. and York, D.A. (1971) *Endocrinol.* 88, 1095-1099
- 24 Malbon, C.C., Lis, S.-Y. and Fain, J.N. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 671-678
- 25 Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and A. Garcia-Sáinz, J.A. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 803, 95-105
- 26 Garcia-Sáinz, J.A., Huerta-Bahena, M.E. and Malbon, C.C. (1989) *Am. J. Physiol.* 256, C384-C389
- 27 Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985) *Biochem. J.* 227, 79-90
- 28 Houslay, M.D., Gawler, D.J. Milligan, G. and Wilson, A. (1989) *Cell. Signal.* 1, 9-22
- 29 Margolis, R.N. (1987) *Life Sci.* 41, 2615-2622
- 30 Lavoie, L., Bollen, M., Stalmans, W. and van de Werve, G. (1991) *Endocrinology* (in press)
- 31 Cohen, P. (1985) *Nature* 296, 613-620

TABLE I

HORMONAL ACTIVATION OF PHOSPHORYLASE α ACTIVITY.

Condition	Phosphorylase α Activity (units / g liver wet weight)	
	lean	obese
Basal	3.1 \pm 0.6 (12)	7.3 \pm 1.2 (15)
Phenylephrine 10^{-6} M + Propranolol 10^{-6} M	12.3 \pm 0.8 (3)	16.6 \pm 1.4 (4)
Isoproterenol 10^{-6} M	14.4 \pm 1.7 (5)	19.4 \pm 2.9 (5)
Glucagon 10^{-7} M	15.5 (2)	17.5 \pm 0.2 (3)

Hepatocytes were incubated and phosphorylase α activity assayed as described under Material and Methods. Results are the means \pm S.E.M. with the number of experiments in parenthesis.

FIGURE 1

EFFECTS OF PMA ON PHENYLEPHRINE STIMULATED PHOSPHORYLASE α ACTIVITY AND PHOSPHATIDYLINOSITOL LABELING. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated with 10 μ M propranolol plus 10 μ M phenylephrine and different concentrations of PMA. Results are presented as percentage of the effect of 10 μ M phenylephrine. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of either 3-4 experiments (phosphorylase α activity) or 5-6 experiments in triplicate (PI labeling). Basal labelling of PI was 147 ± 17 and 158 ± 4 cpm/ 10 mg of cells wet weight, for hepatocytes from lean and obese animals, respectively (means \pm S.E.M., n= 6). Basal and phenylephrine-stimulated phosphorylase α activities are presented in table 1.

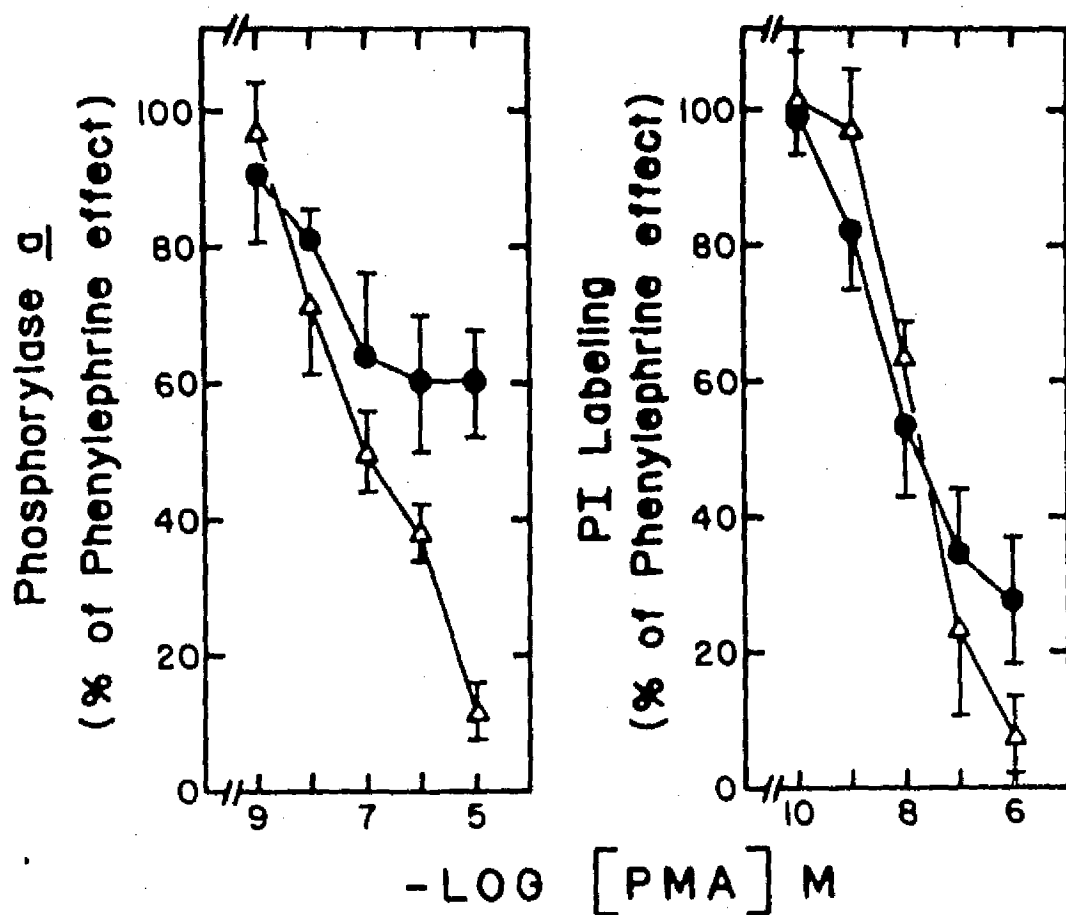


FIGURE 2

EFFECT OF ISOPROTERENOL ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and different concentrations of isoproterenol for 2 min. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments in duplicate using different cell preparations.

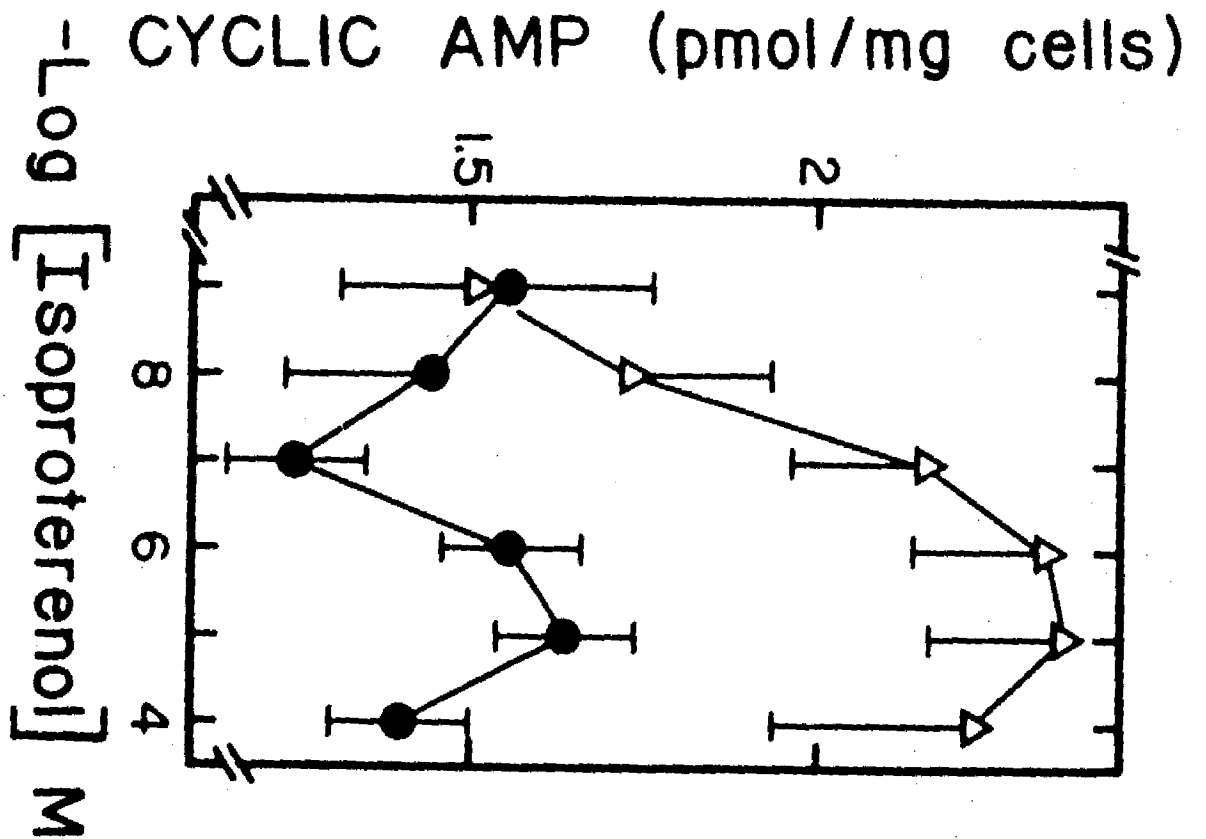


FIGURE 3

EFFECT OF GLUCAGON ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and different concentrations of glucagon for 2 min. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments in duplicate using different cell preparations.

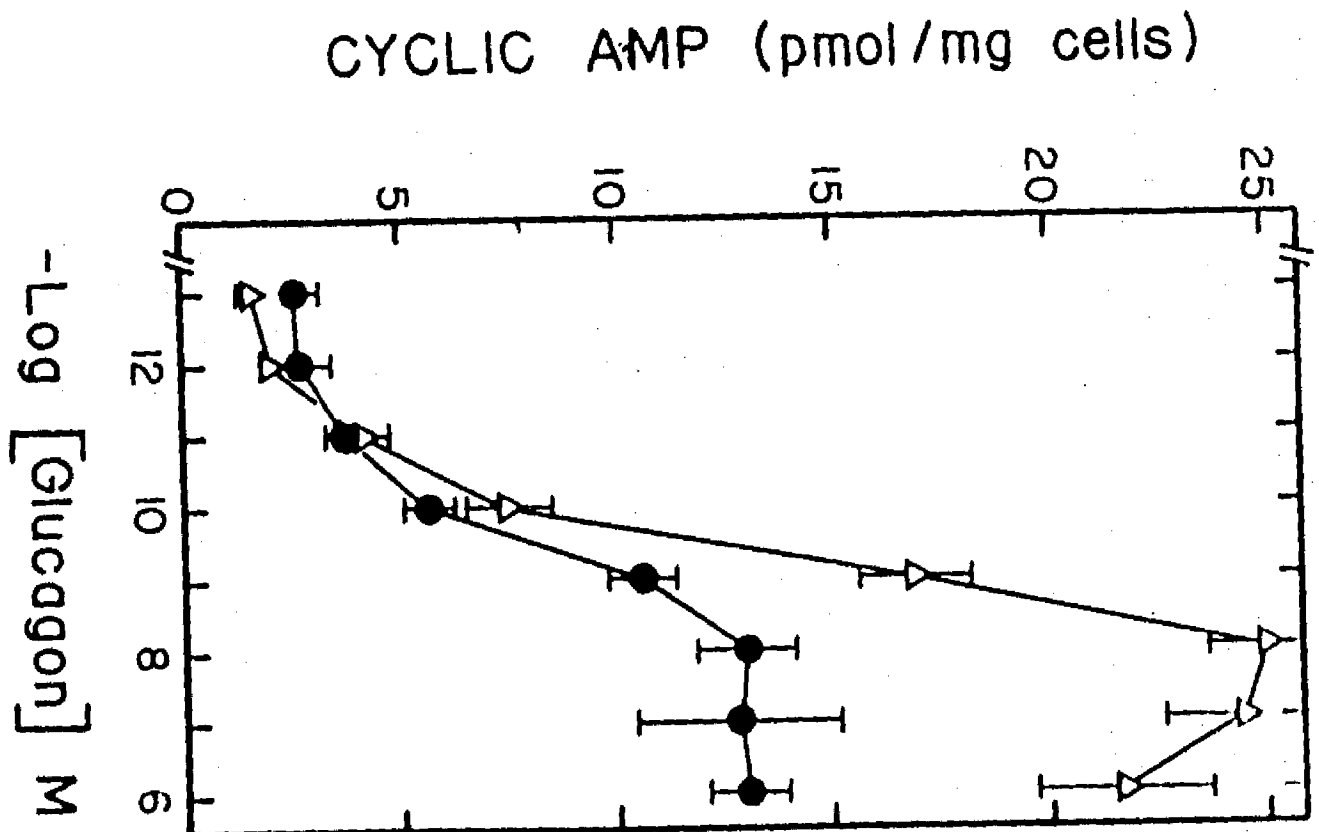


FIGURE 4

EFFECT OF FORSKOLIN ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and different concentrations of forskolin for 2 min. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-7 experiments in duplicate using different cell preparations.

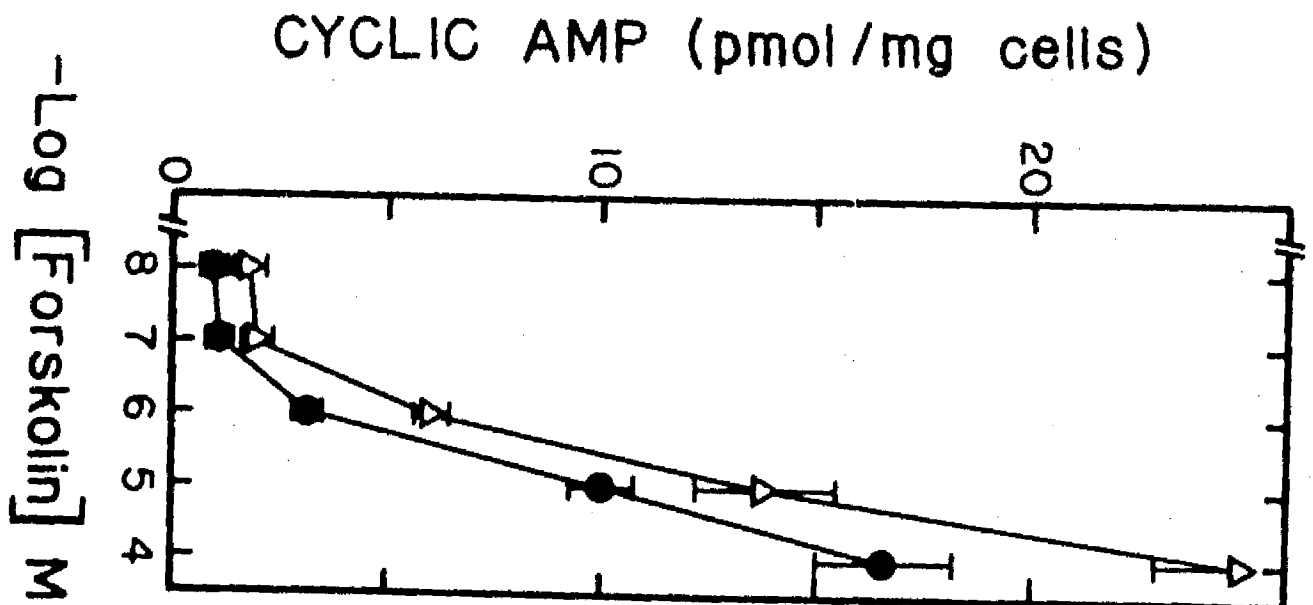


FIGURE 5

EFFECT OF CHOLERA TOXIN ON CYCLIC AMP ACCUMULATION. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and 1 μ g/ml cholera toxin for the times indicated. Plotted are the means of 2 experiments in duplicate using different cell preparations.

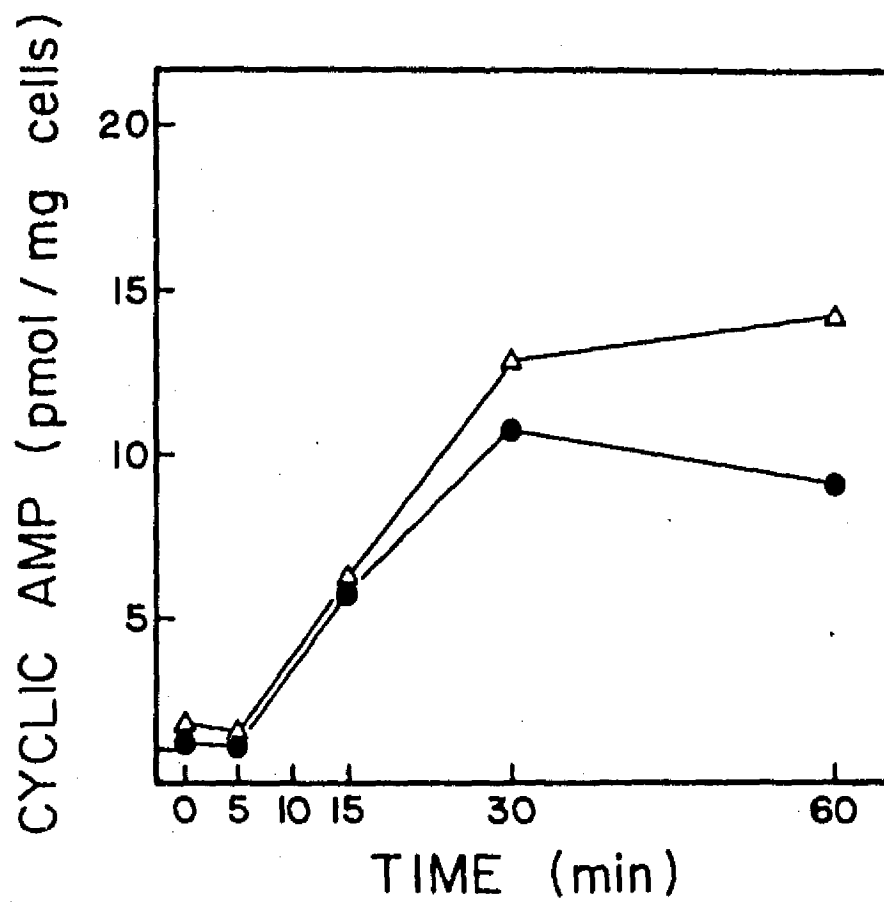


FIGURE 6

EFFECT OF PMA ON THE CYCLIC AMP ACCUMULATION INDUCED BY CHOLERA TOXIN OR GLUCAGON. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated in the presence of 0.1 mM MIX and with either 1 μ g/ml cholera toxin and different concentrations of PMA for 30 min or with PMA for 30 min and 10 nM glucagon for the last 2 min of the 30 min incubation. Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 5-6 experiments in duplicate using different cell preparations.

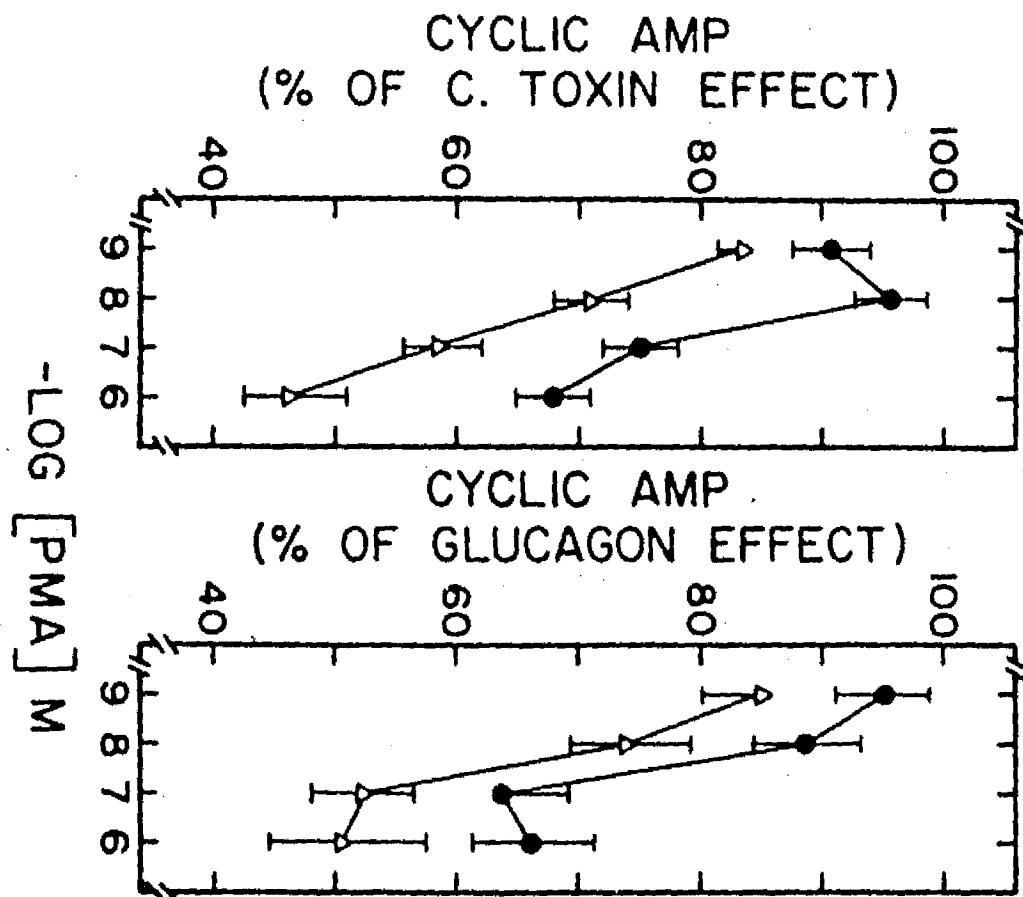


FIGURE 7

EFFECT OF IN VIVO TREATMENT WITH PMA ON PROTEIN KINASE C ACTIVITY. Hepatocytes from lean (open triangles) or obese (closed circles) rats were incubated for 15 min with the concentration of PMA indicated. PKC 1 (left panel) and PKC 2 were separated using DEAE-cellulose column chromatography and activity was assayed as indicated in Materials and Methods. Basal activities were as follows: lean PKC 1, 4.7 ± 0.6 ; lean PKC 2, 1.3 ± 0.2 ; obese PKC 1, 3.9 ± 0.4 ; obese PKC 2, 2.8 ± 0.7 pmol/mg cells wet weight. Results are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 7 experiments performed in triplicate using different cell preparations.

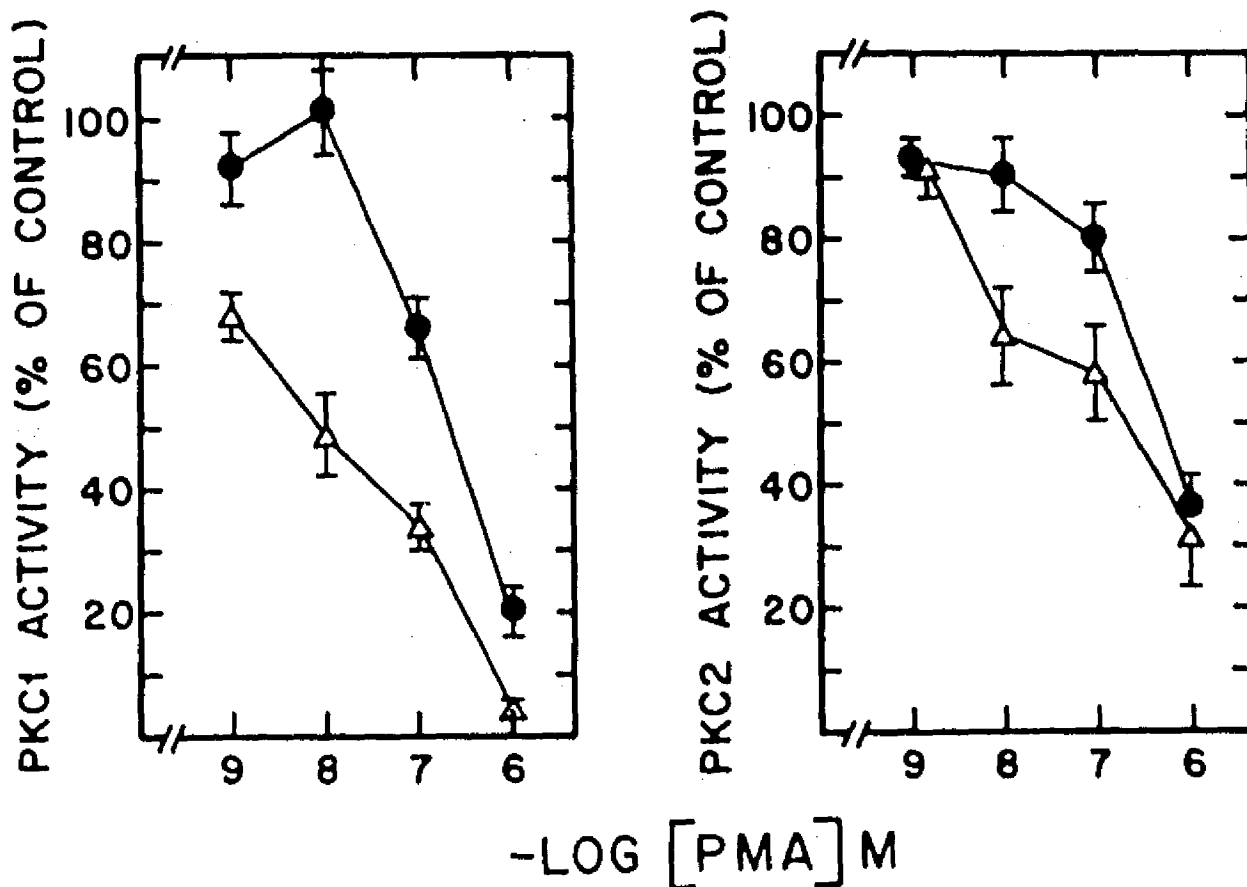


FIGURE 8

SEPARATION OF ISOZYMIC FORMS OF PKC 1 BY HYDROXYAPATITE COLUMN CHROMATOGRAPHY. Cells from lean (panels A and B) or obese (panels C and D) rats were incubated in the absence (panels A and C) or presence of 10 nM PMA (panels B and D). PKC 1 was obtained and subjected to hydroxyapatite column chromatography. The data is representative of 6-7 experiments obtaining similar results.

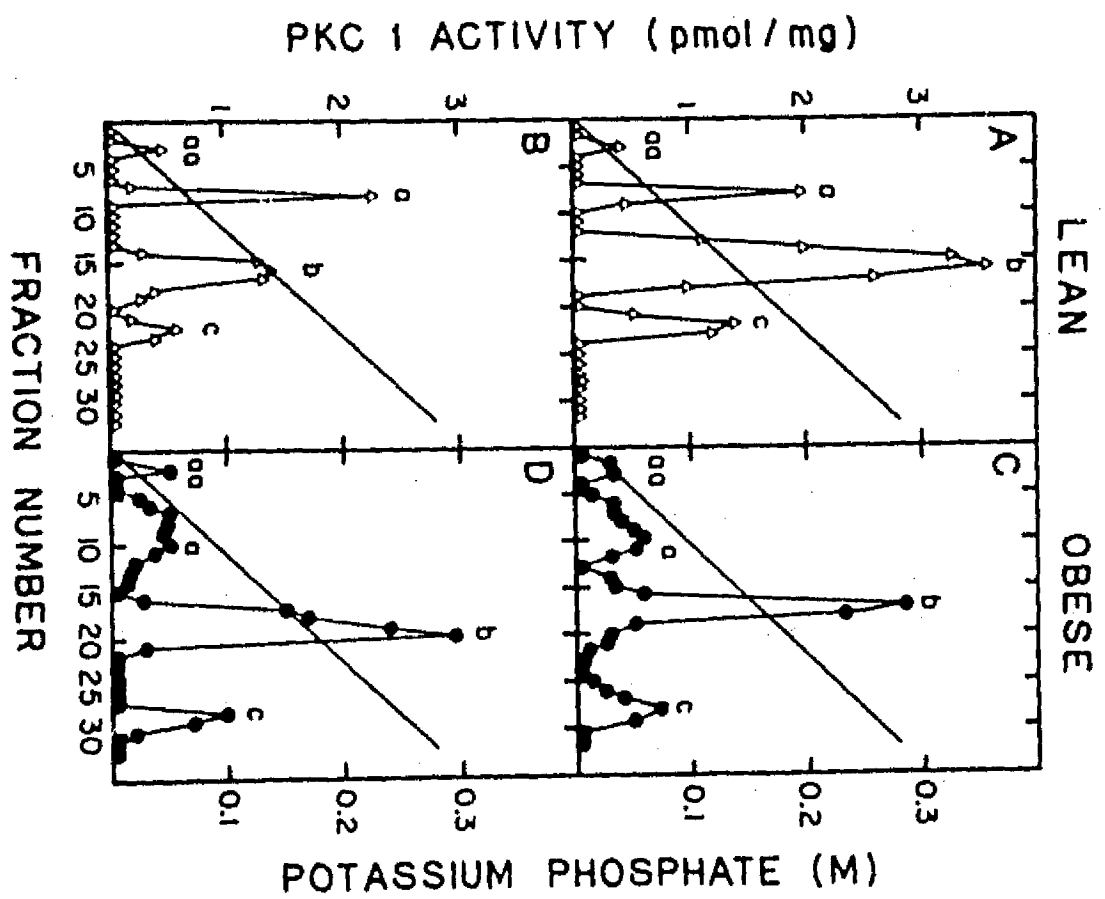
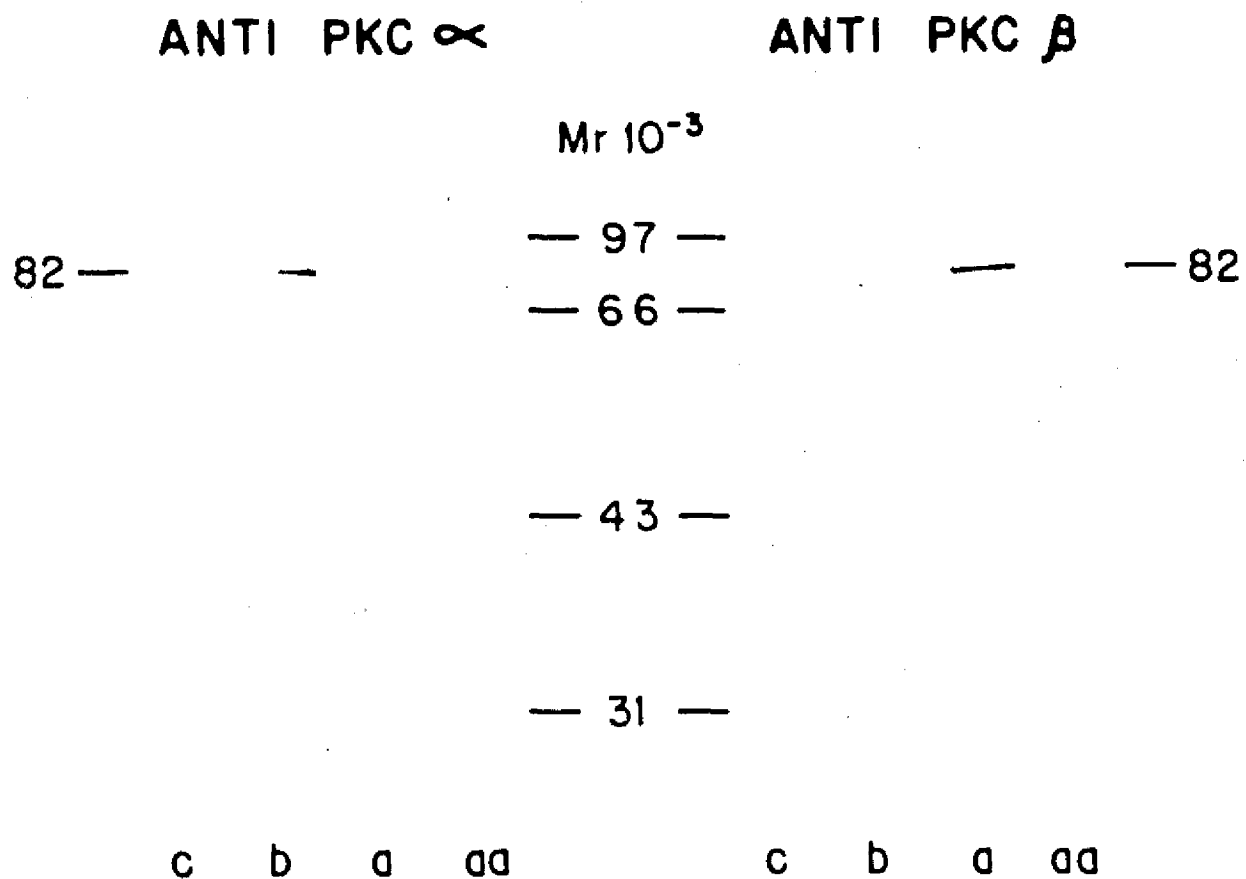


FIGURE 9

IDENTIFICATION OF PKC ISOZYMES BY IMMUNOBLOTTING. Fractions obtained from the hydroxyapatite column chromatography were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. Immunoblot was done with monoclonal antibodies against type α or type β enzyme and developed with alkaline phosphatase-conjugated second antibody. The result shown is representative of three experiments.



Apéndice 4.

Complemento del Apéndice 4.

El interés original en la exploración de éste modelo fué el de reconocer la posible existencia de un mecanismo de transducción α -1 adrenérgico diferente al establecido, mediado por IP_3 - Ca^{2+} . Esto se planteó con base a la resistencia al bloqueo por PMA de la estimulación α -1 adrenérgica que mostraban las ratas obesas en relación a los animales de la misma cepa que no presentaban tal problema genético (ver tabla 1). Este dato se corroboró para el marcaje de PI utilizando el mismo agonista (Fig 1). No obstante ésta incapacidad parcial a ser bloqueado no se presentó con otro agonista α -1 adrenérgico como la epinefrina (Fig A.4.1). La posibilidad de que ésta diferencia se deba a modificaciones en el receptor o a diferencias en el subtipo de receptor queda por determinarse.

Otra posibilidad para explicar éstas diferencias en el modelo experimental es que presenten algunas modificaciones a otros niveles del mecanismo de transducción. Como se ve en la Fig A.4.2a y b, la respuesta a vasopresina y angiotensina en los animales obesos también está disminuida o totalmente ausente en relación a los animales delgados. Como está bien establecido, la respuesta hormonal de estos péptidos

vasopresores comparten el mecanismo de transducción α -1 adrenérgico, con la participación de la proteína Gp y el efector o fosfolipasa C (para revisiones ver, García-Sáinz, 1987; Exton, 1988) y la diferencia observada para la respuesta de vasopresina y angiotensina en las ratas obesas podría sugerir un efecto a un nivel posterior al receptor. Uno de los posibles candidatos es la proteína Gp, dado que se ha propuesto que es un blanco para la acción de la PK-C, la cual está siendo activada durante el proceso de estimulación por los diferentes agonistas. Además se han propuesto al menos dos isoformas de proteínas Gp, que de acuerdo con los autores una podría presentar mayor activación cuando el receptor al que está acoplada y la activa es vasopresina (Taylor et al, 1990) mientras que la otra isoforma de proteína Gp detectada se logró activar por medio del receptor α -1 adrenérgico (Im et al, 1990).

Cabe mencionar que además de las modificaciones a nivel transduccional, éstos animales presentan modificaciones en la respuestas metabólicas estimuladas por hormonas, como la ureogénesis (A.4.3 vs fig 2A del apéndice 5; ver también Maswoswe y Tremblay, 1989). La menor respuesta ureogénica puede estar determinada, además de la regulación transduccional previamente explicada, por la modificación impuesta por otros metabolitos; ya que la ureogénesis estimulada por glucagon o dbAMPC también se vio disminuida (Fig A.4.3b). Entre los posibles moduladores se podrían sugerir a los ácidos grasos, dado su alto contenido la

piruvato deshidrogenasa puede ser modulada negativamente (ver Hansford, 1985), haciendo más lento el flujo a través del ciclo de Krebs, generando de ésta manera menor poder reductor para la síntesis de ATP; por lo tanto, las vías consumidoras de ATP se verían atenuadas.

En resumen, el modelo experimental es complejo como para permitir diseccionar las diferencias transduccionales implicadas en la respuesta α -1 adrenérgica, pues de alguna manera éstas ratas obesas presentan modificaciones a nivel del receptor, la proteína Gp y a nivel de la propagación de la respuesta.

Bibliografía

- Exton J.H. (1988) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 111: 118-124
- García-Sáinz, J.A. (1987) Circ. Res. 61 (SuppII): II-1-II-5.
- Gutman, I and Bergmeyer H.V. (1974) Meth. Enz. Anal. 4: 1791.
- Hansford, R.G. (1985) Rev. Biochem. Pharmacol. 102: 1-72.
- Im, M.J., Riek, R.P. and Graham, R.M. (1990) J. Biol. Chem. 265: 18952-18960.
- Maswoswe, S.M. and Tremblay, G.C. (1989) J. Nutr. 119: 273-279.
- Taylor, S.J., Smith, J.A. and Exton, J.H. (1990) J. Biol. Chem. 265: 17150-17156.

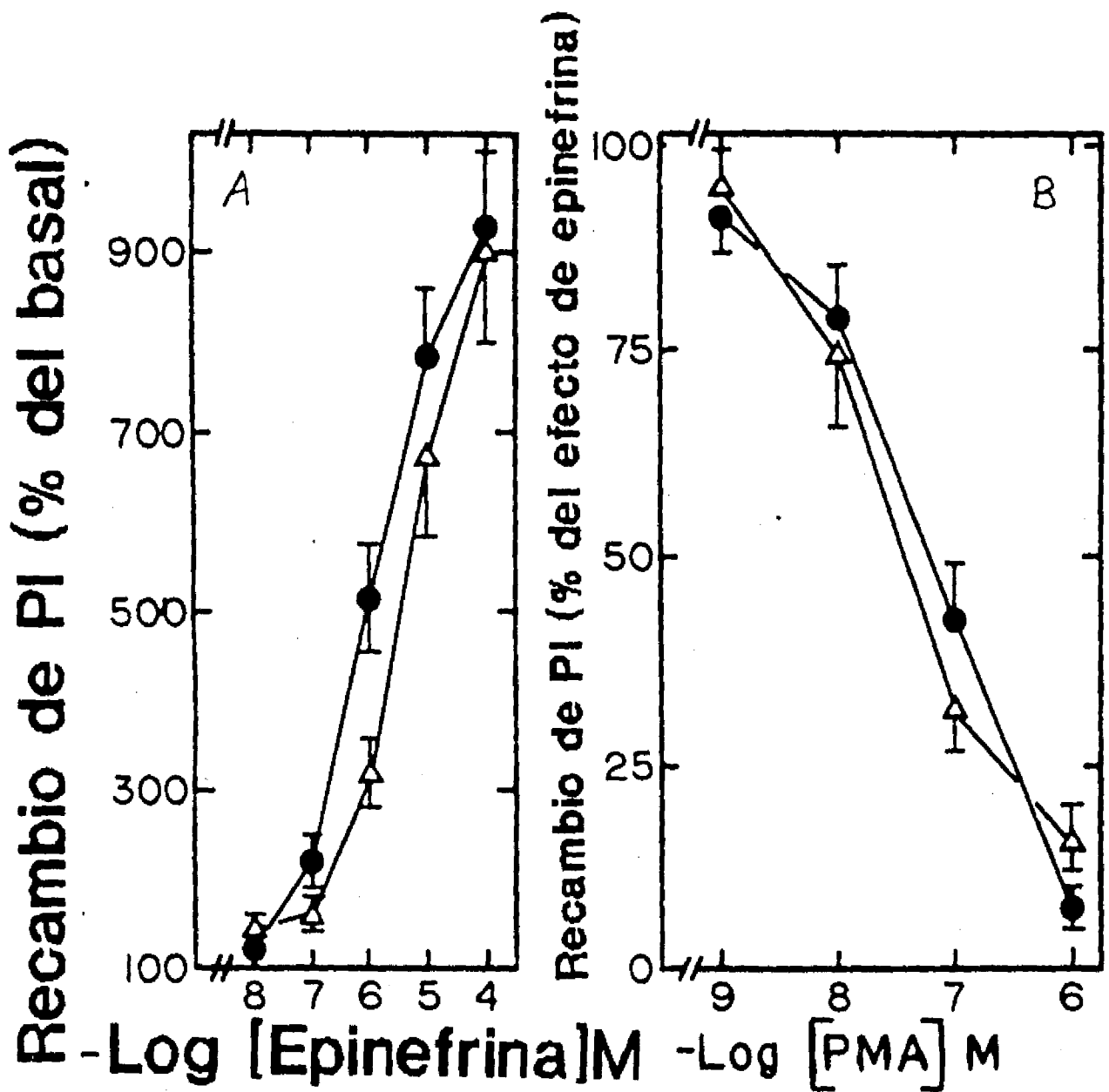


Figura A.4.1. Respuesta α -1 adrenèrgica estimulada por epinefrina y efecto del PMA en hepatocitos de rata Zucker. Recambio de PI.

Los hepatocitos de ratas obesas (●) o esbeltas (△) se incubaron como se describiò en métodos con diferentes dosis de epinaefrina (A) o 10 μ M de epinefrina+ 10 μ M de propranolol y las concentraciones indicadas de PMA (B). Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de 5-6 experimentos realizados por triplicado.

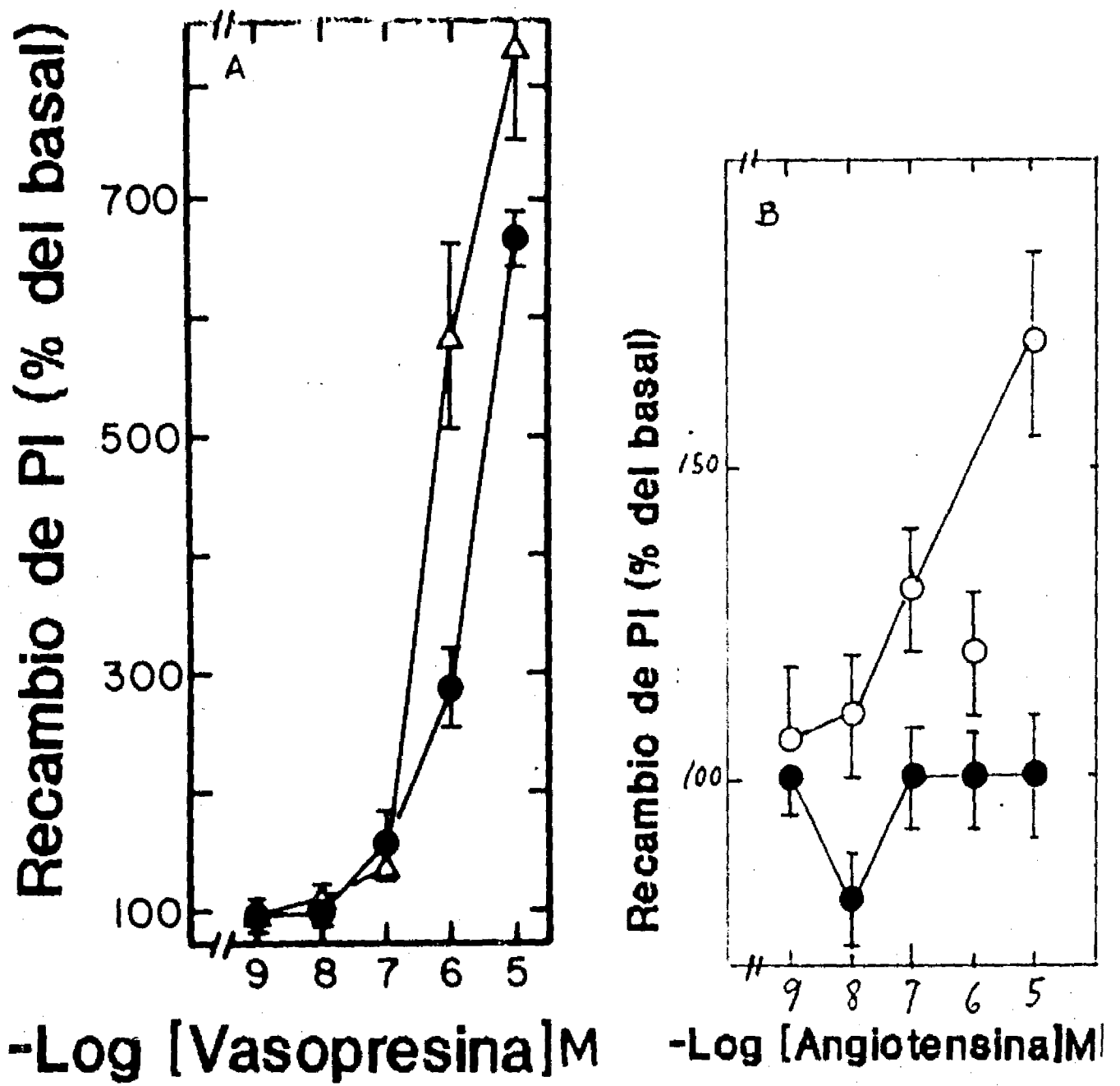


Figura A.4.2. Recambio de PI estimulado por vasopresina y angiotensina en hepatocitos de ratas Zucker.

Los hepatocitos de ratas Zucker obesas (●) o esbeltas (△) se incubaron a las diferentes concentraciones de vasopresina (A) o angiotensina (B) como se describiò en mètodos. Los valores corresponden a la $\bar{X} \pm SE$ de 3 experimentos realizados por triplicado.

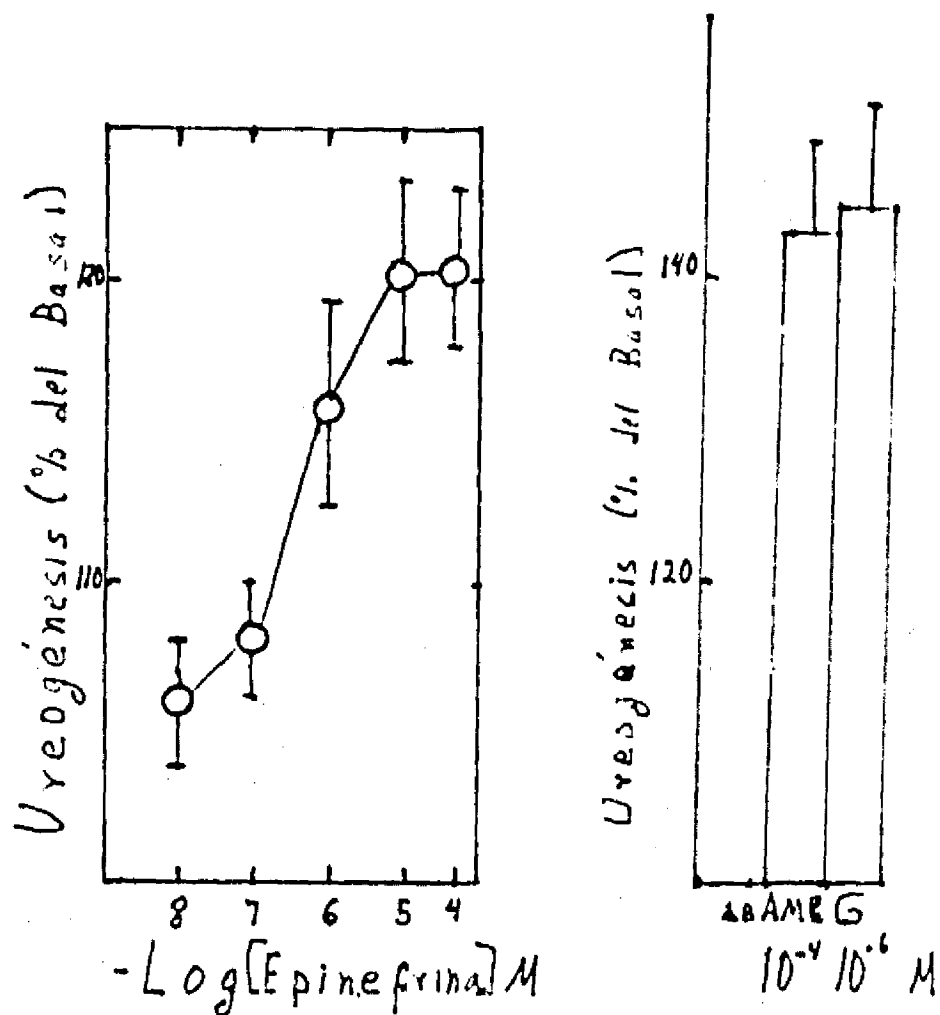


Figura A.4.3. Ureogénesis estimulada por epinefrina, glucagon o dbAMPc en hepatocitos de ratas Zucker obesas.

Los hepatocitos se incubaron en buffer Ringer-Krebs con 20 mM de glutamina y 4 mM de ornitina y las diferentes concentraciones de epinefrina (A), 1 μ M de glucagon o 100 μ M de dbAMPc durante 60 mins a 37°C. Posteriormente se determinó la producción de urea como se describe por Gutman and Bergmeyer (1974). Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de 3 experimentos realizados por triplicado.

Apéndice 5

Desensibilización de la Respuesta α -1 Adrenérgica.
Participación de la Proteína Cinasa-C

Torres-Márquez M.E., Robles-Flóres M. y García-Sáinz J.A.

INTRODUCCION

La desensibilización es la disminución de la respuesta cuando el receptor ha sido previamente estimulado por un agonista. Si el agonista es el mismo en cada estimulación ésta se denomina homóloga, si el agonista de la primera estimulación es diferente al utilizado para retar posteriormente se conoce como desensibilización heteróloga.

Los procesos que pueden estar participando en la desensibilización son el desacoplamiento físico (internalización) o el químico (modificación del receptor, por ejemplo fosforilación). Otro proceso involucrado es la "down regulation" o disminución del número de receptores (para revisiones ver Stiles et al, 1984; Sibley et al, 1988).

Estudios previos del laboratorio habían mostrado diferencias entre los procesos de desensibilización homóloga y heteróloga α -1 adrenérgica así como la participación de la proteína cinasa C (PK-C) en la misma (García-Sáinz et al, 1986a; 1986b; Hernández-Sotomayor y García-Sáinz, 1987).

Así también se han detectado al menos dos isoformas de

PK-C en el hepatocito con sensibilidad diferencial a algunos ésteres de forbol (Robles-Flores et al, 1991). Por lo que en ésta sección se propuso caracterizar con mayor profundidad las diferencias entre la desensibilización homóloga y heteróloga y evaluar la participación de alguna de las isoformas de PK-C en la desensibilización.

METODOLOGIA

Para los estudios de desensibilización las células se preincubaron con el agente indicado, epinefrina 10 μ M más 10 μ M de propranolol o 100 nM de PMA o 100 μ M de O-Me-PMA, por 15 mins. Posteriormente se lavan 2 veces y se incuban con los agente indicados por 1 hora en presencia de 10 μ Ci de 32 P para medir recambio de fofatidilinositol (PI), como se ha indicado en los apéndices anteriores (ver también García-Sáinz et al, 1986); o se incuban en presencia de 20mM de glutamina + 4mM de ornitina para medir ureogénesis (Corvera y García-Sáinz, 1981).

La actividad de PK-C se midió como se describió por Robles-Flores et al (1991).

RESULTADOS

Con la idea de caracterizar comparativamente la desensibilización homóloga y la heteróloga se utilizó la respuesta a epinefrina para ver su desensibilización homóloga y se estudió la desensibilización heteróloga inducida por epinefrina o PMA de la respuesta a epinefrina a

diferentes concentraciones o a vasopresina y angiotensina a dosis máximas. Los modelos utilizados fueron los hepatocitos de rata normal e hipotiroidea, la respuesta que da el último tipo de células semeja la respuesta que se obtiene en los hepatocitos de ratas normales, que es dependiente de Ca^{2+} extracelular (García-Sáinz y Hernández-Sotomayor, 1985).

Se puede observar en la Fig 1A y 1C, que es posible inducir desensibilización homóloga en hepatocitos de ratas normales (Fig. 1A) o de ratas hipotiroideas (Fig 1C), mediada por el recambio de PI. Mientras que la desensibilización heteróloga se observa solo en altas dosis en los hepatocitos de ratas control (Fig 1A) y en todas las concentraciones para los hepatocitos de ratas hipotiroideas (Fig 1C). En la Fig 1B se puede observar que epinefrina o PMA pueden inducir la desensibilización en un nivel posterior al receptor, pues la respuesta a vasopresina o angiotensina es menor a la respuesta de las células control en los hepatocitos de rata normal. En cambio este fenómeno, no se observa en los hepatocitos de rata hipotiroidea (Fig 1D).

En la Fig. 2A se denota que la desensibilización homóloga es también reflejada en la ureogénesis estimulada por epinefrina en los hepatocitos de rata normal (A) y en éste caso el PMA no es capaz de inducir desensibilización de la respuesta. La desensibilización homóloga solo es aparente a concentraciones altas de epinefrina en los hepatocitos de ratas hipotiroideas (Fig 2C). Mientras que de

manera interesante en estas células no es posible ver claramente la desensibilización heteróloga para la ureogénesis.

En los hepatocitos de ratas normales se puede ver la desensibilización de la respuesta a vasopresina inducida por epinefrina pero no la inducida por PMA, mientras que la respuesta a angiotensina no muestra cambios importantes (Fig 2C). En el caso de los hepatocitos hipotiroideos, existe una ligera disminución en la respuesta a vasopresina inducida por el PMA mientras que en la respuesta a angiotensina no se ven modificaciones importantes (Fig 2D).

La segunda parte del trabajo tiene como objeto ver si alguna de las isoformas de PK-C caracterizadas en el hepatocito pudieran incidir más directamente en este proceso de desensibilización. Así para estimular diferencialmente a las isoformas de PK-C se utilizaron diferentes análogos del PMA. Como se puede ver en la Tabla 1, tanto la isoforma PK-C 1 como la PK-C 2 muestran una disminución de su actividad por PMA mientras que solo la isoforma PK-C 1 es inactivada con el O-Me-PMA. De tal manera que con el fin de inactivar la isoforma PK-C 1 se preincubaron a las células por 15 min con O-Me-PMA y se observó posteriormente si se inducía la desensibilización o el bloqueo de la respuesta α -1 adrenérgica.

Se puede observar en la Fig 3 que el recambio de PI disminuyó aún en ausencia de actividad de la PK-C 1. No obstante, la PK-C 2 también participa en la respuesta pues

el PMA es todavía capaz de inducir el bloqueo de la respuesta remanente en la célula. En la Fig. 4 se puede observar que la ureogénesis estimulada por epinefrina no sufre ningún cambio por la inactivación de la PK-C1, pero el bloqueo de la respuesta α -1 adrenérgica por PMA es muy similar al de las células control.

DISCUSION

Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la desensibilización homóloga de la respuesta α -1 adrenérgica es aparente tomando cualquiera de las respuestas inducidas por agonistas α -1 adrenérgicos, evidenciando que ésta es inducida en algún evento muy temprano de la transducción de la señal. Esta podría ser dada al nivel del receptor, posiblemente por una fosforilación del mismo, la cual es dependiente de la ocupación del mismo como se ha sugerido por Leeb-Lundberg et al (1987) y Bouvier et al (1987). Esta posibilidad podría ser apoyada aun más por datos obtenidos previamente en el laboratorio (García-Sáinz et al, 1986a), donde se observó que la desensibilización homóloga no es revertida 1 hora después de haber inducido la desensibilización.

En cuanto a la desensibilización heteróloga parece presentar un fenómeno más complejo, pues ésta se induce por activación de la PK-C, epinefrina o PMA son capaces de activarla, y afecta la respuesta de vasopresina y angiotensina en hepatocitos de rata normal implicando que la

modificación es a un nivel posterior al receptor. Sin embargo, aquí hay una diferencia con los hepatocitos de rata hipotiroidea (correspondiente a la señal α -1 adrenérgica sensible a Ca^{2+} extracelular) ya que la activación de la PK-C induce la desensibilización de la respuesta a epinefrina, pero no la de los péptidos vasopresores. Una diferencia similar a la respuesta mostrada por agonistas α -1 adrenérgicos en relación a los péptidos vasopresores se había mostrado previamente en estas células para la glucogenólisis (Corvera y García-Sáinz, 1983). Estos datos permiten proponer que si el blanco para la acción de la PK-C en la desensibilización heteróloga es Gp como se ha sugerido por otros autores (Sibley et al, 1988; Hernández-Sotomayor et al, 1991) entonces se esperaría encontrar diferencias en las proteínas Gp de los hepatocitos normales y los de ratas hipotiroideas.

La ureogénesis en los hepatocitos de ratas normales no parece mostrar una sensibilidad aparente a la acción de la PK-C, pues el PMA no induce desensibilización de la respuesta a epinefrina, sin embargo pudiera ser un evento estimulado por la otra rama de la respuesta α -1 adrenérgica, o sea el incremento de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (ver Corvera y García-Sáinz, 1983a; Moreno-Sánchez et al, 1991). Esto concordaría también con que la otra respuesta afectada en los hepatocitos de rata normal es la de vasopresina, cuando las células se han preincubado con epinefrina, lo cual se explicaría por una disminución de la respuesta asociada con

el vaciado de las pozas intracelulares de calcio en el retículo sarcoplásmico (ver Torres-Márquez y Moreno-Sánchez, 1991).

La mayor sensibilidad al PMA en los hepatocitos de rata hipotiroidea en la respuesta ureogénica, se ha observado también con otros agonistas capaces de estimular la respuesta como lo es el glucagon (García-Sáinz et al, 1990). En este trabajo se observó que la principal modificación inducida por el PMA dentro de la transducción de la señal en estos hepatocitos, incidía también la $[Ca^{2+}]_c$, lo cual está de acuerdo con que la ureogénesis podría estar más directamente regulada por los incrementos en $[Ca^{2+}]_c$. O de otra forma, que la sensibilidad al PMA para regular la ureogénesis se encuentra a un nivel posterior al receptor y previo a la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico.

En la segunda parte del trabajo relacionada con la regulación de la desensibilización α -1 adrenérgica por una isoforma específica de la PK-C tenemos: Los cambios obtenidos para el recambio de PI sugieren que o bien las dos isoformas de PK-C presentes participan en la desensibilización o que la PK-C 1 se encuentra en tal exceso que el remanente (12.5%) de la proteína es capaz de inducir el proceso. Los datos obtenidos con la ureogénesis nos confirman que la regulación del proceso metabólico estimulado por hormonas podría estar más cercanamente ligado a la otra rama del mecanismo de transducción (incremento de $[Ca^{2+}]_c$). El contar con inhibidores más específicos de las

isoformas de la PK-C, permitirá más adelante definir claramente el papel que podrían jugar cada una de las diferentes isoformas de la PK-C dentro de la regulación de los procesos celulares y en particular dentro de la transducción de señales.

BIBLIOGRAFIA

- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M., Benovic, J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) J. Biol Chem. 262: 3106-3113.
- Corvera S. and García-Sáinz J.A. (1981a) Life Sci. 31: 2493-2498.
- Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1981b) Eur. J. Pharmacol. 72: 387-390.
- Corvera S. and García-Sáinz J.A. (1983a) Biochem. J. 210: 957-960
- Corvera S. and García-Sáinz J.A. (1983b) FEBS Lett. 153: 366-368.
- García-Sáinz J.A. and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6727-6730.
- García-Sáinz J.A. and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1987) Eur. J. Biochem. 163: 417-421.
- García-Sáinz J.A., Hernández-Sotomayor S.M.T. and Tussié-Luna M.I. (1986a) Biochem. Biophys. Acta 887: 69-72.
- García-Sáinz J.A., Tussié-Luna M.I. and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1986b) Biochem Biophys Acta 887: 73-79.
- García-Sáinz J.A., Macías-Silva M., Hernández-Sotomayor

- S.M.T., Torres-Márquez M.E., Trivedi D. and Hruby V.J.
(1990) Cell. Signaling 2:235-243.
- Hernández-Sotomayor S.M.T., Macías-Silva M., Malbon C. and García-Sáinz J.A. (1991) Amer. J. Physiol. 260: C259-265
 - Leeb-Lundberg L.M.F., Cotecchia S., DeBlasi, A., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) J. Biol. Chem. 262: 3098-
 - Moreno-Sánchez R., Torres-Márquez M.E. and Gómez-Poyou, A. (1991) Trends in Bioenerg. and Biomemb. 1: 119-150.
 - Sibley D.R., Benovic J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz R.J. (1988) Endocrino. Rev. 9: 38-56.
 - Robles-Flores M., Alcantara-Hernández R. and García-Sáinz J.A (1991) Biochem Biophys Acta (en prensa)
 - Stiles, G.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1984) Physiol. Rev. 64: 681-743.
 - Torres-Márquez M.E. and Moreno-Sánchez R. (1991) Procc. Western Pharmacol. Soc. (en prensa)

Figura 1. Desensibilización Homóloga y Heteróloga de la Respuesta α -1 adrenérgica en hepatocitos de ratas normales e hipotiroideas. Recambio de PI.

Respuesta dependiente de la concentración de epinefrina en hepatocitos de rata normal (A) o ratas hipotiroideas (C). Las células se incubaron por 15 mins como se describió en métodos sin ninguna adición (\circ), con epinefrina $10 \mu\text{M}$ más propranolol $10 \mu\text{M}$ (\square) o con 100nM de PMA (\triangle).

Respuesta a vasopresina 10^{-5}U o angiotensina $10\mu\text{M}$ en hepatocitos de rata normal (B) o hipotiroidea (D). Las células fueron preincubadas por 15 mins como se describió en métodos sin ningún agente (Π), con epinefrina $10\mu\text{M}$ + $10 \mu\text{M}$ de propranolol (\blacksquare) o con 100 nM de PMA (\blacksquare).

Todos los valores representan la $X \pm \text{SE}$ de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

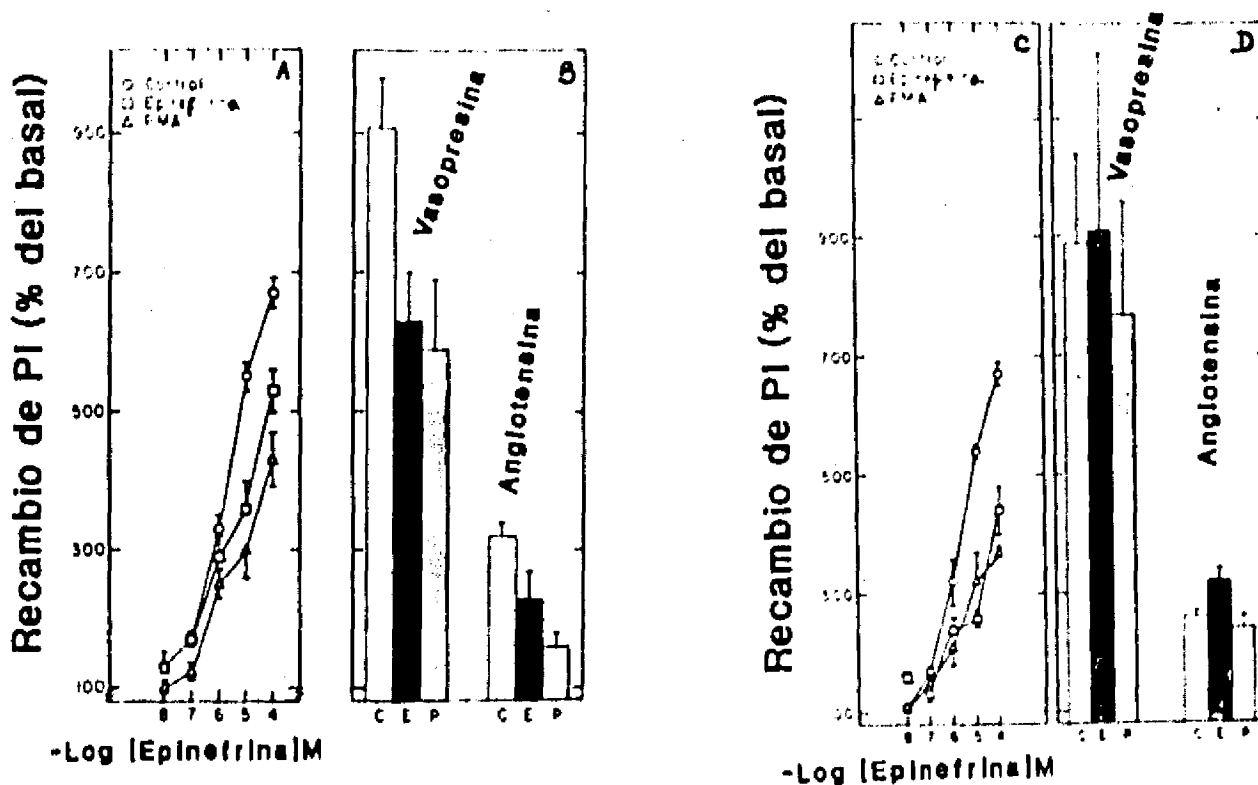


Figura 2. Desensibilización Homóloga y Heteróloga de la Respuesta α -1 adrenérgica en hepatocitos de ratas normales e hipotiroideas. Ureogénesis.

Las indicaciones corresponden a las descritas para la figura 1, con la excepción de que las células fueron tratadas como se describió en la metodología para medir ureogénesis.

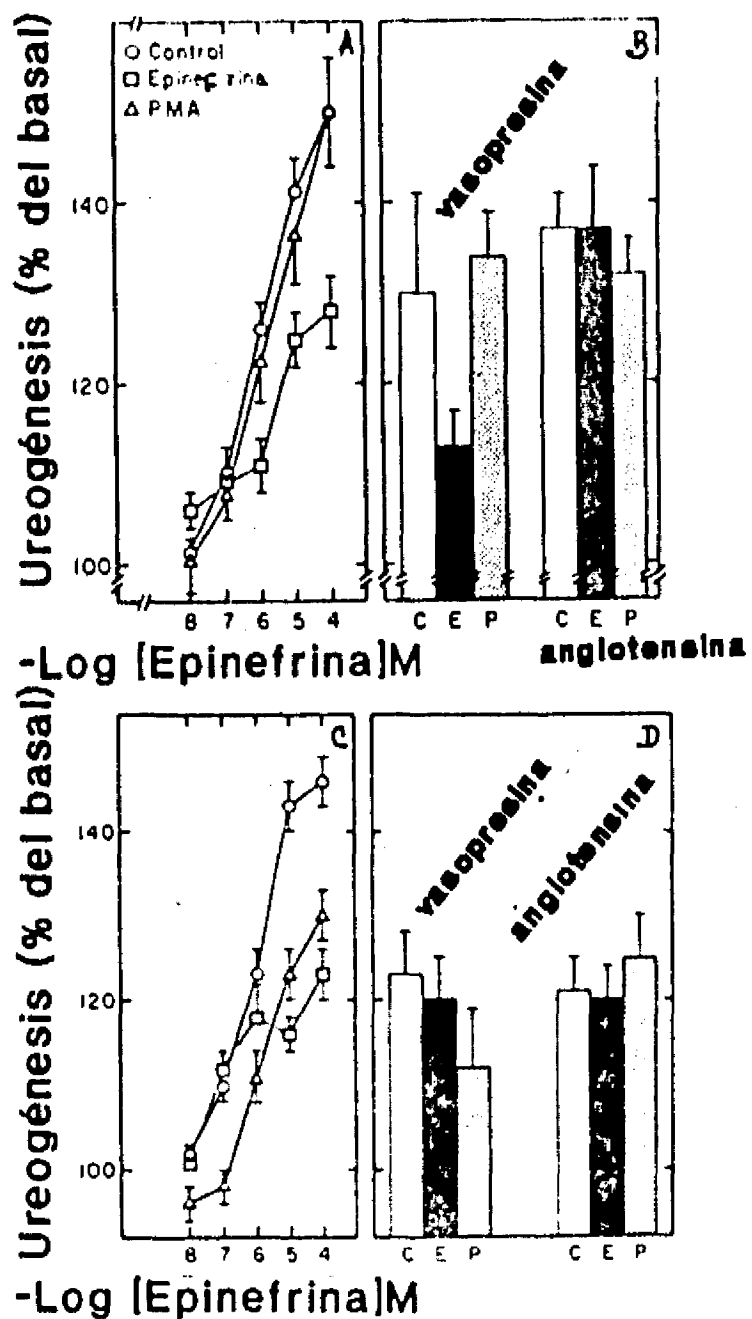


Tabla 1. Efecto de la preincubación con ésters de forbol sobre las actividades de PK-C en hepatocitos de rata.

		% de la actividad basal	
		PK-C 1	PK-C 2
PMA	(10^{-6} M)	4.6 ± 3.0	67 ± 4.0
PhdBu	(10^{-5} M)	96.5 ± 9.0	80 ± 4.0
OMe-PMA	(10^{-4} M)	12.5 ± 1.6	104 ± 4.8
α -PH	(10^{-4} M)	101.0 ± 5.8	93 ± 8.9

Los hepatocitos se incubaron por 15 min con PMA o sus análogos a las concentraciones indicadas. Las actividades de las isoformas se determinaron como se describió en la metodología.

Figura 3. Desensibilización y Bloqueo de la Respuesta α -1 Adrenérgica en Hepatocitos de Rata "carentes" de PK-C 1. Recambio de PI

Los hepatocitos se preincubaron por 15 min en presencia (●) o en ausencia (○) de O-Me-PMA 100 μ M. Se lavaron y expusieron a las diferentes concentraciones de epinefrina + 10 μ M de propranolol (A) o 10 μ M de epinefrina + 10 μ M de propranolol más las concentraciones indicadas de PMA (B) y se procesaron para la determinación del Recambio de PI como se describió en métodos. Los valores representan la $X \pm SE$ de al menos tres experimentos realizados por triplicado.

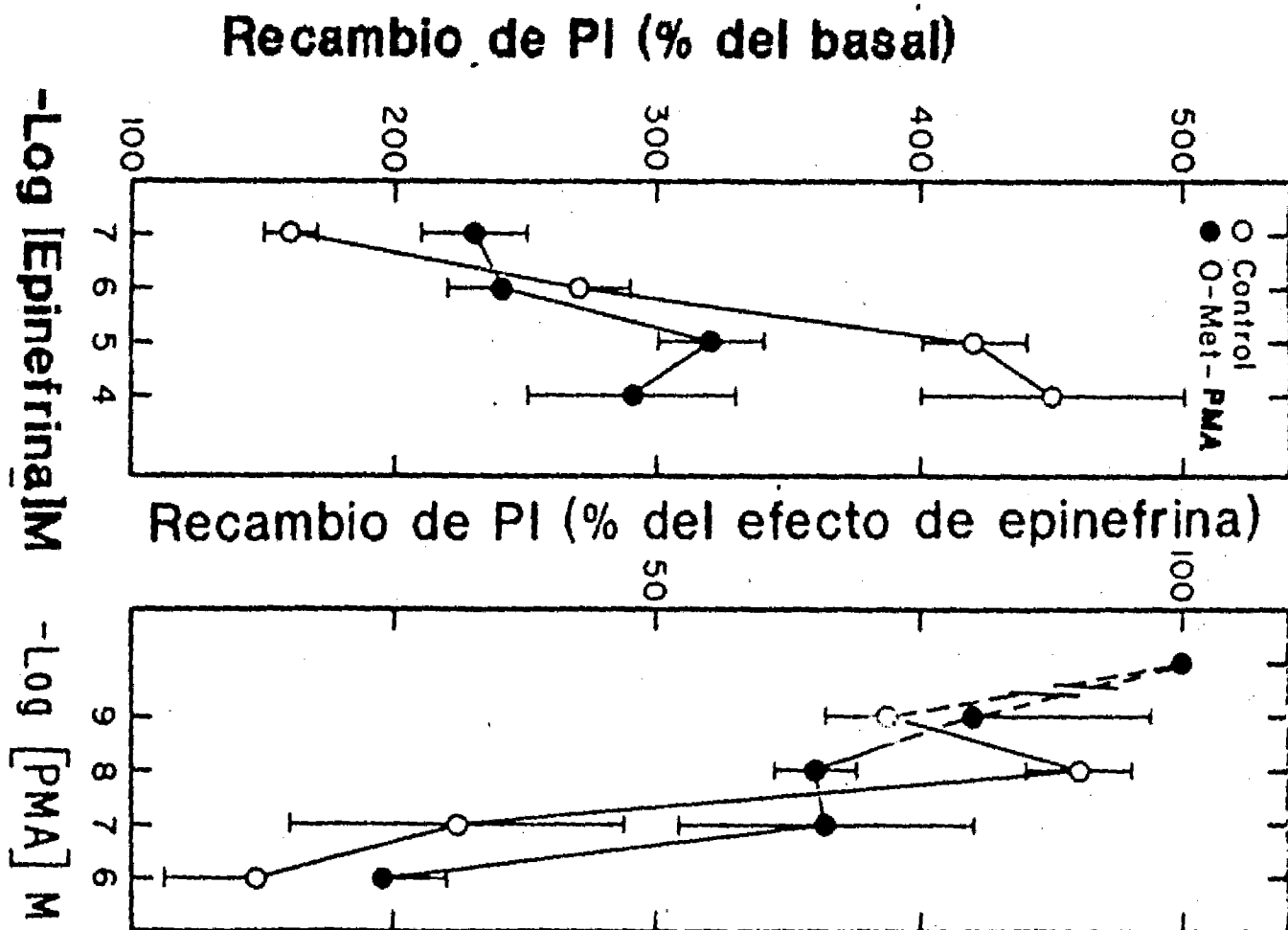
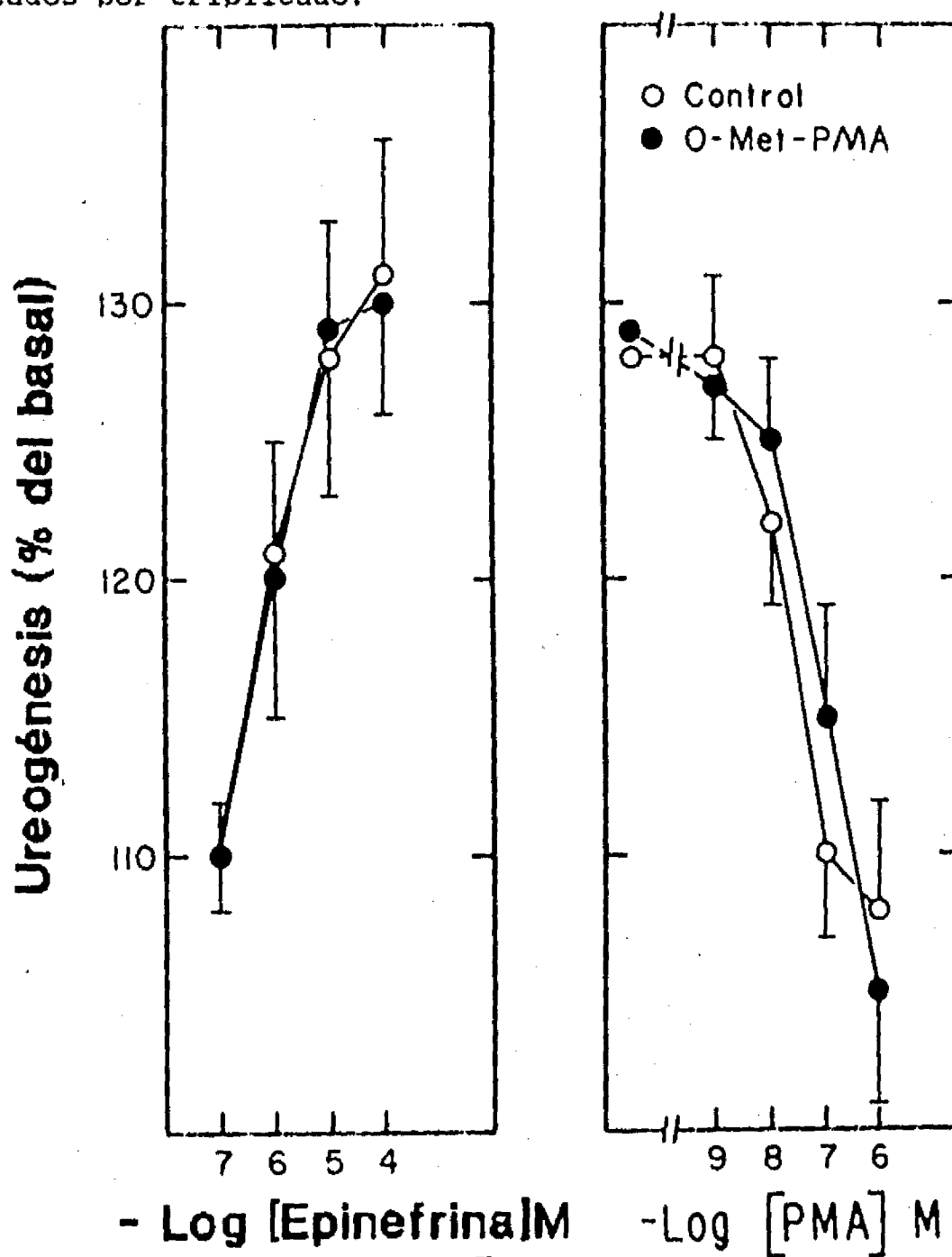


Figura 4. Desensibilización y Bloqueo de la Respuesta α -1 Adrenérgica en Hepatocitos de Rata "carentes" de PK-C 1. Ureogénesis.

Los símbolos utilizados corresponden a los indicados en la Fig 3. El tratamiento dado a las células en este caso es el descrito en los métodos para medir ureogénesis. Los valores representan la $\bar{X} \pm SE$ de al menos tres experimentos realizados por triplicado.



* Nota. Hay una discusión específica en cada trabajo.

DISCUSION GENERAL.

Se mencionaron en la introducción una serie de evidencias bioquímicas y farmacológicas que sugerían la existencia de más de un subtipo de receptor α -1 adrenérgico y posiblemente de más de un mecanismo de transducción involucrado en la respuesta. En los apéndices 1 y 2 se dan evidencias de la existencia funcional de los subtipos de adrenoceptores α -1A en aorta y α -1 B en hígado y adipocito blanco. Los hallazgos obtenidos para hígado y aorta se han confirmado recientemente (Lomasney et al, 1991) por técnicas de biología molecular, con las que se han detectado los RNAm de los receptores en cuestión.

La detección de los subtipos de receptores se realizó por medio del recambio de fosfatidilinositol, lo que implica la generación de IP_3 , independientemente de si la respuesta es mediada por el subtipo α -1 A o α -1 B. De esta manera estos datos no explican el otro posible mecanismo transduccional que podría operar en la respuesta α -1 adrenérgica ni están de acuerdo con la proposición de algunos autores que han sugerido que el mecanismo de transducción del adrenoceptor α -1A no es mediado por IP_3 (Wilson y Minneman, 1990; Michel et al, 1990). La participación de otros sistemas efectores propuesta para otros tipos de tejidos no parece estar operando en los hepatocitos. Como se mostró previamente por Iñiguez (1987)

para el caso de la fosfolipasa A2 o por Paras (1987) para la adenilato ciclasa en nuestro laboratorio. Una posibilidad alterna que se planteó a partir de algunos resultados obtenidos en los apéndices 4 y 5 es la mediación en la respuesta por las dos posibles proteínas Gp, una de ellas operando en la transducción de los péptidos vasopresores y uno de los mecanismos de transducción α -1 adrenérgico y la otra posiblemente operando más exclusivamente en relación al sistema α -1 adrenérgico.

La segunda parte del trabajo estuvo dirigida a la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica, principalmente a la influencia que pudiera ejercer la PK-C. La participación de la PK-C en la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica es evidente en los apéndices 3, 4 y 5. De manera interesante se muestra que la regulación por PK-C puede ser diferente en el subtipo de adrenoceptor. Esto es que regulara al adrenoceptor α -1 B y que prácticamente carezca de efecto en el subtipo α -1 A (apéndice 3). No obstante, para asegurarse, quedaría por demostrar que la sensibilidad al PMA es similar a la observada en la aorta en otros sistemas donde se encuentre predominantemente al adrenoceptor α -1 A y/o demostrar que el efecto observado en la aorta no se debe a una menor afinidad de las isoformas de PK-C que estuvieran presentes en el tejido.

La posibilidad de que alguna de las isoformas de PK-C presentes en los tejidos pudiera "dirigir" la regulación mediada por PK-C hacia el receptor se exploró más

directamente en los apéndices 4 y 5. Sin embargo, para el modelo de las rata Zucker obesas vs delgadas, no se observaron diferencias significativas en las isoformas de la cinasa que pudieran explicar su relativa insensibilidad al PMA para bloquear la respuesta α -1 adrenérgica. Por otro lado en el apéndice 5 se confirmó la participación de la PK-C en la desensibilización, pero no se logró diseccionar la participación de una de las dos isoformas presentes en el hepatocito en dicho fenomeno. Por lo que nuestros datos sugieren que puede haber participación de las dos isoformas de la PK-C o que la fracción no eliminada de una de ellas es suficiente para contribuir significativamente al fenomeno. La carencia de inhibidores específicos para cada isoforma de PK-C, fue una de las limitantes de estos trabajos, ya que la posibilidad de regulación de funciones específicas por una isoforma de PK-C se ha obtenido por otros autores para la regulación de la producción o inhibición de AMPc estimulada por hormonas o para funciones determinadas en células de músculo liso (Kariya et al, 1989; Gusovsky y Gutkind, 1991).

Las implicaciones fisiológicas que tendría la existencia de subtipos de receptores α -1 adrenérgicos es que cada respuesta se podría regular de manera diferente. Como se ha mencionado en secciones previas de esta tesis, el receptor α -1 es susceptible a la fosforilación por PK-C y los sitios potenciales de fosforilación, localizados en la tercera asa citoplásmica de esta proteína; muestran algunas

diferencias entre el subtipo α -1 A y α -1 B. Además, el subtipo α -1 B es más susceptible a la acción de la PK-C y existen reportes que sugieren que la acción del subtipo α -1A es dependiente de calcio extracelular. De acuerdo con lo anterior, cada tejido de un organismo que recibiera un estímulo α -1 adrenérgico podría tener una regulación diferente. Extendiendo esta regulación diferencial a los tejidos que contienen ambos subtipos de receptores α -1 adrenérgicos, por ejemplo el riñón, implicaría que la respuesta generada por uno u otro de los receptores podría sostenerse de manera diferente.

CONCLUSIONES

- Existen diferentes subtipos de receptores α -1 adrenérgicos funcionales en hígado (α -1B) y aorta (α -1A) [Apéndice 1], así como en el adipocito (α -1 B) [Apéndice 2]. Estos se detectaron por el orden de potencia con que los diferentes antagonistas (prazosina, 5-MU, WB4101 y CEC) pueden bloquear el recambio de PI estimulado por epinefrina. Estos datos fueron corroborados por los estudios de enlazamiento del ligando α -1 adrenérgico [125 I]HEAT en el adipocito [Apéndice 2].
- La PK-C es un elemento participante en la regulación de la respuesta α -1 adrenérgica de una manera específica. Esto es, que el receptor adrenérgico α -1 A es menos sensible que el α -1 B, a la acción de la PK-C [Apéndice 3]. Resultados preliminares del laboratorio sugieren que en otros tejidos

que expresan el receptor α -1A existe también una sensibilidad pequeña a la acción de la PK-C. Por otro lado una isoforma de la PK-C puede tener substratos específicos, regulando solo parcialmente algunos de los procesos [Apéndice 4] por ejemplo que dada la diferencia en las asas carboxílicas de los receptores α -1 adrenérgicos, potenciales sitios de fosforilación (ver referencias en la introducción) de la PK-C hubiera mayor afinidad para alguna isoforma determinada de esta. Entre estos procesos en los que podría participar solo alguna de las isoformas de PK-C estria la desensibilización [Apéndice 5].

BIBLIOGRAFIA

- Agranoff, B.W., Murthy, P., Seguin, E.B. (1983) J. Biol. Chem. 258: 2076-2078.
- Ahlquist, R.P. (1948) Am. J. Physiol. 153: 586-600.
- Ahmad, Z., Lee, F.T., DePaoli-Roach, A., and Roach, P.J. (1984) J. Biol. Chem. 259: 8743-8747.
- Akhtar, R.A. and Abdel-Latif, A.A. (1984) Biochem. J. 224: 291-300.
- Albert, P.R. and Tashjian, A.H. Jr. (1984) J. Biol. Chem. 259: 15350-15363.
- Albert, P.R. and Tashjian, A.H. Jr. (1985) J. Biol. Chem. 260: 8746-8759.
- Albert, P.R., Wolfson, G. and Tashjian, A.H. Jr. (1987) J. Biol. Chem. 262: 6577-6581
- Alkon, D.L., Kubota, M., Neary, J.J., Naito, S., Coulter, D. and Rasmussen H. (1986) Biochem. Biophys. Res. Comm. 134: 1245-1253
- Altin, J.G. and Bygrave, F.L. (1988) Biol. Rev. 63: 551-

611.

- Barnes, P., Karliner, J., Hamilton, C. and Dollery, C. (1979) *Life Sci.* 25: 1207-1214.
- Baudiere, B. Guillon, G., Bali, J-P and Jard S (1986) *FEBS Lett.* 198: 321-325
- Beg, S.H., Stonik, H.B., Brewer and H.B.Jr. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 1682-1687.
- Beguinot, L., Hanover, J.A., Ito, S., Reichert, N.D., Willingham, M.C and Pastan, I. (1985) *Procc. Natl. Acad. Sci.* 82:2774-2778.
- Bell, J.D., Buxton, I.L.O. and Brunton, L.L. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2625-2628
- Bennet, C.F. and Crooke, S.T. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 13789-13797.
- Bentley, S.M., Drew, G.M. and Whiting, S.B. (1977) *Brit. J. Pharmacol.* 61: 116-117.
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. (1984) *Nature* 312: 315-321.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.* 212: 473-482.
- Berthelson, S. and Pettinger, W.A. (1977) *Life Sci.* 21: 595-606, 1977.
- Besterman, J.M. and Cuatrecasas, P. (1984) *J. Cell. Biol.* 99: 340-343.
- Biden, T.J. and Wolheim, C.B. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 11931-11934.
- Bockino, S.B, Blackmore, P.F., Wilson, P.B. and Exton J.H. (1987a) *J. Biol. Chem.* 262: 15309-15315.
- Bockino, S.B., Wilson, P.B. and Exton, J.H. (1987b) *FEBS Lett.* 225: 201-204.
- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L.M., Benovic, J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1987) *J. Biol Chem.* 262: 3106-3113.
- Boyer, J. L., Garcia, A., Posadas, C. and García-Sáinz, J.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 8076-8079.
- Boyer, J.L, Downes, C.P. and Harden, T.K. (1989a) *J. Biol. Chem.* 264: 884-890.

- Boyer, J.L., Hepler, J.R. and Harden, T.K. (1989b) Trends in Pharmacol. Sci. 10: 360-364.
- Brown, G.L. and Gillespie, J.S. (1957) J. Physiol. 138:81-102
- Burck, R.M., Luini, A. and Axelrod, J. (1986) Procc. Natl. Acad. Sci. 83: 7201-7205.
- Burns, C.P. and Rozengurt, E. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 116: 931-938.
- Bylund, D.B, Martinez, J.R. and Pickle, D.L. (1982) Mol. Pharmacol. 21: 27-35.
- Cannon, W.B. and Uridil, J.E. (1921) Am. J. Physiol. 58: 353-364.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) J. Biol. Chem. 257: 7847-7851.
- Cerione, R. A., Codina, J., Kilpatrick, B.F., Staniszewski, C., Gierschick, P., Somers, R.L., Spiegel, A.M., Birnbaumer, L., Caron, M. G. and Lefkowitz, R.J. (1985) Biochemistry 24: 4495-4503.
- Charest, R., Prpic, V., Exton, J.H. and Blackmore, P.F. (1985a) Biochem. J. 227: 79-90.
- Charest, R., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1985b) J. Biol. Chem. 260: 15789-15794.
- Chew, C.S. and Brown, M.R. (1986) Biochem. Biophys. Acta 888: 116-125.
- Clark, A.J. (1926a) J. Physiol 61: 530-546.
- Clark, A.J. (1926b) J. Physiol 61: 547-556.
- Cockroft, S. (1984) Biochem. Biophys. Acta 795:37-46.
- Convents, A., DeBacker, J-P., André, C. and Vacquelin G. (1989) Biochem. J. 262: 245-251.
- Cornett, L.E. and Norris, J.S. (1985) Moll. Cell. Biochem. 67: 47-53.
- Correze, C., d'Alayer, J., Coussen, F. Berthiller, G., Deterre, P. and Monneron, A. (1987) J. Biol. Chem. 262: 15182-15187.
- Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1981) Eur. J.

Pharmacol. 72: 387-390.

- Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1983a) FEBS Lett. 153: 366-368.

- Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1983b) Biochem. J. 210: 957-960.

- Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1984) Biochem. Biophys Res. Comm. 119: 1128-1133.

- Corvera, S., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and García-Sáinz, J.A. (1984) Biochem. Biophys. Acta 803: 95-105.

- Corvera, S., Schwartz, K.R., Graham, R.M. and García-Sáinz, J.A. (1986) J. Biol. Chem. 261: 520-526.

- Costa, M.R. and Catterall, W.A. (1985) Cell, Mol, Neurobiol 4: 291-295.

- Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. and Kobilka, B.K. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 7159-7163.

- Cowen, D.S., Baker, B. and Dubyak, G.R. (1990) J. Biol. Chem. 265: 16181-16189.

- Crane, J.K., Campanile, C.P. and Garrison, J.C. (1982) J. Biol. Chem. 257: 4959-4965.

- Dale, M.M. and Penfield, A. (1984) FEBS Lett. 175: 170-172

- Dale, H.H. (1906) J. Physiol. (Lond) 34: 163-206.

- Davis, R.J. and Czech M.P. (1984) J. Biol. Chem. 259: 8545-8549.

- De Paoli-Roach, A., Roach, P.J., Zucker, K.E. and Smith, S.S. (1986) FEBS Lett. 197: 149-153.

- De Virgilio, F., Lew, D. P. and Pozzan, T. (1984) Nature 310: 691-693

- Delbeke, D., Kojima, I., Dannies, P.S. and Rasmussen, H. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. 123: 735-741

- Dewald, B., Payne T.G. and Baggoliolini, M. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. 125: 367-373.

- Dickinson, K.E.J., Leeb-Lundberg, L.M.F., Heald, S.L., Wikberg, J.E.S., DeBernardis, J.F., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1984) Moll. Pharmacol. 26: 187-195.

- Dixon, J.F. and Hokin, C.E. (1987) J. Biol. Chem. 262:

13892-13895.

- Downes, C.P. and Wustesman M.M. (1983) *Biochem. J.* 216: 633-640.
- Downes, C.P., Mussat, M.C. and Michell, R.H. (1982) *Biochem. J.* 203: 169-177.
- El-Rafai, M.F., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 4375-4386.
- Eurolimsky, J.D., Friedberg, I. and Rozengurt, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 19188-19194
- Fain, J.N. and García-Sáinz, J.A. (1980) *Life Sci.* 26: 1183- 1194.
- Fain, J.N., Brindley, D.N., Pittner, R.A., Hawthorne, J.N. (1985) *FEBS Lett.* 192: 251-254.
- Farley, J. and Auerbach, S. (1986) *Nature* 319: 220-223
- Fluerstein, N., Monos, D.S. and Cooper, H.L. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 206-213
- Franklin, T.J. (1980) *Biochem. Pharmacol.* 29: 853-856.
- Fukui, T., Lutz, R.J. and Lowenstein, J.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 17730-17737.
- Fung, B. K-K. (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 10495-10503.
- Gaddum, J.H. (1926). *J. Physiol* 61: 141-150.
- Galizzi, J.P., Qar, J., Fosset, M., Van Renterghem, C., and Lazdunski, M. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 6945-6950.
- Gallo-Payet, N, Guillon, G., Balestre, M.N. and Jard, S. (1986) *Endocrinology* 119: 1042-1047.
- García-Sáinz, J.A. (1987) *Circ. Res.* 61 (SuppII): II-1-II-5.
- García-Sáinz, J.A. and Fain, J,N, (1980a) *Biochem. J.* 186: 781-789.
- García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1980b) *Mol. Pharmacol.* 18:72-77.
- García-Sáinz, J.A. and Hernández-Sotomayor S.M.T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163: 417-421.
- García-Sáinz, J. A. and Gutierrez-Venegas, G (1989) *FEBS Lett.* 257: 427-430.

- García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T., and Tussié-Luna, M.I. (1986a) *Biochem. Biophys. Acta.* 887: 73-79.
- Garcia-Sáinz, J.A. Tussie-Luna, M.I. and Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1986b) *Biochem. Biophys. Acta.* 887: 69-72.
- García-Sáinz, J.A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Tsujimoto, G. and Hoffman, B.B. (1985) *Eur. J. Pharmacol.* 112: 393-397.
- García-Sáinz, J.A., Macias-Silva, M., Hernández-Sotomayor, S.M.T., Torres-Márquez, M.E., Trivedi, D., and Hruby, V.J., (1990) *Cell. Signaling* 2: 235-241.
- Geynet, P., Ferry, N. and Hanoune, J. (1981) *Biochem. Pharmacol.* 12: 1665-1675.
- Geynet, P., Ferry, N., Borsodi, A. and Hanoune, J. (1982) *Biochem. Pharmacol.* 30: 1665-1675.
- Gilman, A.G. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56:615-649.
- Gleason, M.M. and Flaim, S.F. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138: 1362-1369
- Goodhardt, M, Ferry, N., Geynet, P. and Hanoune, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 11577-11583.
- Gould, K.L. (1985) *Cell* 42: 849-855
- Graham, R.M. and Lanier, S.M. (1986) Identification and Characterization of Alpha-adrenergic receptors. In: *Heart and Cardiovascular System* (Fozzard H.A. et al Eds.) Raven Press. New York pp. 1059-1096.
- Graham, R.M., Hess, H.J., and Homcy, Ch. (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 15174-15181.
- Green, D.A. and Latimer, S.A. (1986) *Diabetes* 35: 242-245.
- Griedling, K.K. Rittenhouse, S.E., Brock, T.A., Ekstein, L.S., Gimbrone, M.A. Jr. and Alexander, R.W. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 5901-5906.
- Gross, G., Hanft G. and Medorn, H.M. (1989) *Eur J Pharmacol.* 169: 325-328.
- Guellaen, G., Aggerbeck, M., Vaguelen, G., Strosberg, D. and Hanoune, J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 1114-1120.
- Guicheney, P. and Meyer, P (1982) *Br. J. Pharmacol.* 73: 33-39.

- Gusovsky, F. and Gutkind, J.S. (1991) Mol. Pharmacol. 39: 124-129.
- Hadcock, J.R., Ros, M. and Malbon, C (1989) J. Biol. Chem. 264: 13956-13961.
- Han Ch., Abel, P.W and Minneman, K.P. (1987) Mol Pharmacol. 32: 505-510
- Hanft, G. and Gross, G. (1989) Br. J. Pharmacol. 97: 691-700.
- Harris, R.M., Kongsamet, S. and Miller, R.J. (1986) Biochem. Biophys. Res. Comm. 134: 1298-1305
- Hepler, J.R., Earp, H.S. and Harden, T.K. (1988) J. Biol. Chem. 263:7610-7619.
- Hernández-Sotomayor, S.M.T. and García-Sáinz, J.A. (1984) FEBS Lett. 166: 385-388.
- Hill, A.V. (1909) J. Physiol. (Lond) 39: 361-372.
- Hofer, H.W., Schlatter, S. and Grafe, M. (1985) Biochem. Biophys. Res. Comm. 132: 424-429.
- Hoffman, B.B. and Lefkowitz, R.J. (1980) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20: 581-608.
- Hoffman, B.B., Dukes, D.F. and Lefkowitz, R.J. (1981) Life. Sci. 28: 265-272.
- Hollinsworth, E.B., Sears, E.B. and Daly J.M. (1985) FEBS Lett. 184: 339-342.
- Housey, G.M., Johnson, M.D., Hsiao, W.L.W., O'Brian, C.A., Murphy, J.P., Kirschneier, P. and Weinstein, I.B. (1988) Cell 52: 343-354.
- Hoyer, D., Jones, C.R., Ford, W. and Palacios, J.M. (1990) Eur. J. Pharmacol. 188: 9-16
- Huerta, Bahena, J., Villalobos-Molina, R and García-Sáinz, J.A. (1982) Life Sci. 30: 1757-1762.
- Haganir, R.L., Miles, K., Greengard, P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6968-6972.
- Hutton, J.C., Peshavaria, M. and Brocklehurst, K.W (1984) Biochem. J. 224: 483-490
- Im, M.J., Riek, R.P. and Graham, R.M. (1990) J. Biol. Chem. 265: 18952-18960.

- Imboden, J.B. and Stobo, J.D. (1985) J. Exp. Med. 161: 446-456.
- Iñiguez, LL. J. (1987) Acción α -1 adrenérgica hepática: efecto de la toxina pertussis, bromuro de fenacilo y antagonista. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias UNAM.
- Irvine, R.F., Anggard, E.E. and Downes, C.P. (1985) Biochem. J. 229: 505-511.
- Izzo, N.J. Jr., Seidman, C.E., Collins, S. and Colucci, W.S. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6268-6273.
- Jacobs, S., Sahyoun N.E Saltiel, A.R. and Cuatrecasas P. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 6211-6213.
- Jenks, W.P. (1975) Adv. Enzymol 43: 219-410.
- Johnson, R.D. and Minneman, K.P. (1987) Mol Pharmacol. 31: 239-246.
- Johnson, R.M. and Garrison, J.C. (1987) J. Biol. Chem. 262: 17285-17293.
- Joseph, S.K. and Williams, R.J. (1985) FEBS Lett. 180: 150-154.
- Kariya, K.I., Kamara, Y., Fukuzaki, H., Hagiwara, M., Hidaka, H., Fukumoto, Y and Takai, Y (1989) Biochem. Biophys. Res. Comm: 1020-1027.
- Karlner, J.S., Simpson, P.C., Honbo S. and Woloszyn, W. (1986) Cardiovascular Res. 20: 221-228.
- Katada, T., Bokoch, G.M., Northrup, J.K., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984a) J. Biol. Chem. 259: 3568-3577.
- Katada, T., Northrup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M. and Gilman, A.G. (1984b) J. Biol. Chem. 259:3578-3585.
- Katakami, Y. Kaibuchi, K., Sawamura, M., Takai, Y and Nishizuka, Y (1984) Biochem. Biophys. Res Comm. 121: 573-578.
- Kawamoto, S., and Hidaka, H. (1984) Biochem. Biophys. Res Comm. 118: 736
- Kawanishi, T., Blank, L. M., Harootunian, A.T., Smith, M.T. and Tsien, R.Y. (1989) J. Biol. Chem. 264: 12859-12866.
- Kikkawa, U., Kishimoto, A., and Nishizuka, Y. (1989) Ann. Rev. Biochem. 58: 31-44.

- Kirk, C.J., Verrinder, T.R. and Hems, D.A. (1977) FEBS Lett. 83: 267-271.
- Kishimoto, Y., Takai, Y and Nishizuka, Y (1977) J. Biol. Chem. 252: 7449-7452.
- Kohl, C., Schmitz, W., Scholz, H. and Scholz, J. (1990) Circ. Res. 66: 580-583.
- Koshland, D.E. Jr., Nemethy G and Filmer, D. (1966) Biochemistry 5: 365-385.
- Kristjansson, G.I., Zweir, H., Oestreicher, A.B. and Gispen, W.H. (1982) J. Neurochem 39: 371-378.
- Labarca, R., Janowski, A., Patel, J. and Paul, S.M. (1984) Biochem. Biophys. Res Comm. 123: 703-709
- Lambert, T.L. Kent R.S. and Whorton, A.R. (1986) J. Biol. Chem. 261: 15288- 15293.
- Lands, A.M., Arnold, A., McAuliff, J.P., Luduena, F.P. and Brown, T.C. (1967). Nature 214: 597-598.
- Langer, S.Z. (1977) Br. J. Pharmacol. 60: 481-497.
- Lane, T.A., Lamkin, G.E. and Wancewicz, E. (1989) Biochem. Biophys. Res Comm. 161: 945-952
- Langley, J.N. (1905) J. Physiol (Lond) 33: 374-413.
- Lapetina, E.G., Briley, P.A. and DeRobertis, E. (1976) Biochem. Biophys. Acta 431: 624-630.
- Le, H-M. and Fain, J.N. (1989) Biochem. Biophys. Acta 1013: 73-79.
- Le Peuch, C.J., Ballester, R. and Rosen, O.M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 6858-6862.
- Lee, L-S and Weinstein, I.B. (1978) Science 202: 313-315.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Dickinson, K.E.J., Heald, S.L., Wikberg, J.E.S., DeBernardis, J.F., Winn, M., Arendsen, D.L., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 115: 946-951.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Dickinson, K.E.J., Heald, S.L., Wikberg, J.E.S., Hagen, P-O., Debernardis, J.F., Winn, M., Arendsen, D.L., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1985) J. Biol. Chem. 259: 2579-2587.
- Lim, M.S., Sutherland, C and Walsh, M.P. (1985) Biochem.

Byophys Res Comm. 132: 1187-1195.

- Limas, C.J. (1980) Biochem. Biophys. Res Comm. 96: 1378-1383.

- Limberg, B. and Starke, K (1983) Naunyn Schmiedeberg's Arch. Physiol 324: 75-78.

- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W-Y., Schwinn, D., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1991) J. Biol. Chem. 266: 6365-6369.

- Lynch, C.J., Charest, R., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1985) J. Biol. Chem. 260: 1593-1600.

- MacIntyre D.E., MacNicol, A. and Drummond A.H. (1985) FEBS Lett. 180: 160-164.

- Malaise, W.J., Dunlop, M.E., Mathias, P.C.F., Malaissé-Lagal, F and Sever, A. (1984) Eur. J. Biochem. 149: 23-27

- Martin, F.J. and Kowalchick, J.A. (1989) J. Biol. Chem 264: 20917-20922.

- Martin, T.F.J. (1983) J. Biol. Chem. 258: 14816-14822.

- Masters S.B., Quinn, M.T. and Brown, J.H. (1985) Mol. Pharmacol. 27: 325-332.

- Matozaki, T., Sakamoto, C., Nagao, M. and Baba, S (1986) J. Biol. Chem. 261: 1414-1420.

- May, W.S., Jacobs, S. and Catrecasas P. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 2006-2020.

- Mazzei, G.J. and Kuo, J.F. (1983) Biochem. J. 218: 361-369.

- Meisenhelder, J., Suh, Po, G., Rhee, S.G. and Hunter, T. (1989) Cell 56: 1009-1122

- Michel, A.D., Loury, D.N. and Whiting, D.N. (1989) Br. J. Pharmacol. 98: 883-889.

- Michell, M.C., Hanft, G. and Gross, G. (1990) Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 341: 385-387.

- Michell, R.H. (1975) Biochem. Biophys. Acta 415: 81-147.

- Mickey, J., Tate, R. and Lefkowitz, R.J. (1975) J. Biol. Chem. 250: 5727-5729.

- Minneman, K.P., Han, Ch., and Abel, P.W. (1988) Moll. Pharmacol. 33: 509-514.

- Moolenaar, L.G., Tertoolen, J., de Latt, S.W. (1984) Nature 312: 371-373.
- Moran M.C. and Perkins M.E. (1958) J. Pharmacol. 124: 223-237.
- Moreno, F.J., Mills, I., García-Sáinz, J.A. and Fain, J.N. (1983) J. Biol. Chem. 258: 10938-10943.
- Moreno-Sánchez, R. and Torres-Márquez, M.E. (1991) Int. J. Biochem. (en prensa).
- Moreno-Sánchez, R., Torres-Márquez, M.E. and Gómez-Poyou, A. (1991) Trends in Bioenerg. and Biomemb. 1: 119-150.
- Morgan, N.G., Rumford, G.M. and Montague, W. (1985) Biochem. J. 228:713-718.
- Morgan, N.G., Blackmore, P.F. and Exton, J.H. (1983) J. Biol. Chem. 258: 5110-5116.
- Morgan N.G., Waynick, L.E. and Exton, J.H. (1984) Eur. J. Pharmacol. 96: 1-10.
- Morgan R.O., Chang J.P. and Catt K.J. (1987) J. Biol. Chem. 262: 1166-1171.
- Morris, A.J., Waldo, G.L., Boyer, J.L., Hepler, J.R., Downes, C.P. and Harden, T.K. (1990) Regulation of Phospholipase C. in: G proteins and Signal Transduction (Nathanson, N.M and Harden, T.K. Eds) Rockefeller Univ. Press. Chapter 5.
- Morris, C. and Rozengurt, E. (1988) FEBS Lett. 231:311-316.
- Morrow, A.L. and Creese, I. (1986) Moll. Pharmacol. 29: 321-330.
- Movsesian, M.A., Nishikawa, M. R. and Adelstein, R.S. (1984) J. Biol. Chem 259:8029-8032.
- Muallem, Sh., Pandol, S.J. and Becker, T.G. (1989) J. Biol. Chem. 264: 205-212.
- Naccache, P.H., Molski, T.F.P.; Borgeaut, P. White, J.R. and Sha'afi, R.I (1985) J. Biol. Chem. 260:2125-2131.
- Nanberg, E. and Putney, J.W. Jr. (1986) FEBS Lett. 195: 319-322
- Nasmith P.E. and Grinstein, S. (1987) J. Biol. Chem. 262: 13558-13566

- Nelemans, A., Hoiting, B., Mollenan, A., Duin, M. and den Hertog, A. (1990) *Eur. J. Pharmacol.* 189: 41-49.
- Nishikawa, M., Hidaka, H. and Adelstein, R.S. (1983) *J. Biol. Chem* 258: 14069-14083.
- Nishizuka, Y. (1988) *Nature* 334: 661-665.
- Orellana, S.A., Solski, P.A. and Brown J.H. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 5236-5209
- Osborne, R. and Tashjian, A.H. (1981) *Endocrinology* 108: 1164-1170
- Palvimo, J. Mahonen, A. and Mäenpää, P.H. (1987) *Biochem. Biophys. Acta* 931: 376-383.
- Paras Fernández, M.T. (1987) Mecanismos de la respuesta alfa₁-adrenérgica: Efecto de la edad. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM.
- Paton, W.D.M. (1961) *Proc. R. Soc. Lond (Biol)* 154: 21-32.
- Persons, D.A. Wilkeinson, W.O., Bell, R.M. and Finn, O.J. (1988) *Cell* 53: 447-458.
- Pocote, S.L., Frye, R.A., Sinter, R.A, Terbush, D.R., Lee, S.A. and Holz, R.W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci* 82: 930-934
- Poggioli, J., Sulpice, J.C. and Vasort, G. (1986) *FEBS Lett.* 206: 292-298.
- Powell, C.E. and Slater I.H. (1958) *J. Pharmacol.* 122:480-488.
- Pushpendran, C.K, Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1983) *FEBS Lett.* 160: 198-202.
- Pushpendran, C.K, Corvera, S. and García-Sáinz, J.A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 118: 451-459.
- Putney, J.W., Mackennay, J.S, Aub D.L. and Leslie, D.A (1984) *Moll. Pharmacol.* 26: 261-266
- Quilliam, L.A., Dobson, R.M. and Brown, B.L. (1989) *Biochem. J.* 262: 829-834
- Rapiejko, P.J., Northrup, J.K., Evans, T., Brown, J and Malbon, C (1986). *J. Biol. Chem.* 240: 35-40.
- Rasmussen, H., Farder, J., Kojima, I and Scriabine, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res Comm.* 122: 776-784

- Regazzi, R., Li, G., Ullrich, S., Jaggi, C and Wollheim, C.D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 9939-9944
- Rhee, S.G., Suh, P.G., Ryu, S.H. and Lee, S.Y. (1989) *Science* 244: 546-550.
- Rink T.J., Sánchez, A. and Hallan, T.J. (1983) *Nature* 305: 317-319
- Rittenhouse, S.E. and Sasson, J.P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 8657-8660.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.E. (1971) *Cyclic AMP*. Academic Press, New York.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. and Sutherland, E.W. (1967) *Ann. N.Y. Acad. Sci. (USA)*. 139: 703-723.
- Robles-Flores, M., Alcantara-Hernández, R. and García-Sáinz, J.A (1991) *Biochem. Biophys. Acta* (en prensa)
- Rooney, T.A., Sass, E.J. and Thomas, A.P. (1989) *J. Biol. Chem.* 264: 171131-17141.
- Rouot, B.R. and Snyder, S.H. (1979) *Life Sci.* 25:769-774.
- Rubin, R.P., Godfrey, P.P., Chapman, D.A. and Putney, J.W. Jr. (1984) *Biochem. J.* 219: 655-659.
- Ruffolo, R.R. Jr. Waddell, J.E. and Yaden, E.L. (1982) *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 221: 309-314.
- Ruffolo, R.R.Jr., Turowski, B.S. and Patil, P.N. (1977) *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 378-380.
- Ryu, S.H., Lee, S.Y, Lee, K-Y and Rhee, S.G. (1987) *FASEB J.* 1: 388-393.
- Sawutz, D.G., Lanier, S.M., Warren, C.D. and Graham, R.M. (1987) *Mol Pharmacol.* 32: 565-571.
- Schatzman, R.C., Grifo J.A., Merrick, W.C. and Kuo, J.F. (1983) *FEBS Lett.* 147: 167-171.
- Schimmel, R.J. (1988) *Biochem. J.* 253: 93-102.
- Schimmel, R.J. and Elliot, M.E. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 135: 823-829.
- Schwin, D.A., Lomasney, J.W., Lorenz, W., Szklut, P.J., Fremeau, R.T., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Cotecchia, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 8183-8189.
- Seidman, C.E., Hess, H.J., Homcy, C.J. and Graham, R.M.

- (1984) *Biochemistry* 23: 3765-3770.
- Shackelford, D.A. and Trowbridge, I.S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 11706-11712.
 - Shears, S.B., Storey, D.J., Morris, A.J., Cubitt, A.B., Parry, J.B., Michell R.H. and Kirk, C.J. (1987) *Biochem J.* 242: 393-402.
 - Sibley, D.R., Benovic J.L., Caron, M.G. and Lefkowitz R.J. (1988) *Endocrino. Rev.* 9: 38-56.
 - Slivka, S.R. and Insel P.A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4200-4207.
 - Smith C.D., Lane, B.C., Kusaka, I., Verghese M.W. and Snyderman, R. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 5875-5878
 - Snavely M.D, and Insel, P.A. (1982) *Moll. Pharmacol.* 22: 532-536.
 - Sperti, G. and Colucci, W.S. (1987) *Moll. Pharmacol.* 32: 37-42.
 - Sternweis, P.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 631-637.
 - Strathman, M. and Simon, M.I. (1990) *P.N.A.S.* 87: 9113-9117.
 - Strathman, M., Wilkie, T. and Simon, M.I. (1989) *P.N. A.S.* 86: 7407-7409.
 - Sudgen, D., Vanecek, J., Klein, D.C., Thomas, T.P. and Anderson, W.B. (1985) *Nature* 314: 359-361.
 - Suh, P.G., Ryu, S.H., Moon, H.W., Suh, S.G. and RHee, S.G. (1988) *Cell* 54: 161-169.
 - Summers, T.A and Crutz, C.E. (1985) *J Biol Chem* 260: 2437
 - Takai, Y., Kikkawa, U., Kaibuchi, K. and Nishizuka, Y., (1984) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 18: 119.
 - Tanekawa, T. and Nagai, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* 256: 6769-6775.
 - Taylor, C.W. (1990) *Biochem. J.* 272: 1-13.
 - Taylor, S.J. and Exton, J.H. (1991) *FEBS Lett.* 286: 214-216.
 - Taylor, S.J., Smith, J.A. and Exton, J.H. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 17150-17156.

- Terman, B.I. and Insel, P.A. (1986) J. Biol. Chem. 261: 5603-5609.
- Terman, B.I., Riek, R.P., Grodski, A., Hess, H.J. and Graham, R.M. (1990) Moll Pharmacol. 37: 526-534.
- Teshima, R., Ikebuchi, H. and Terao, T. (1984) Biochem. Biophys. Res Comm. 125: 867-874.
- Thomas, A.P., Alexander, J., Williamson, J.R. (1984) J. Biol. Chem 259: 5574-5584
- Thomopoulos P., Testa, U., Gourdin, M.F., Hervy C, Titeaux, M and Vainchaker, W. (1982) Eur. J Biochem. 129: 389-393.
- Tohkin, M., Yagami, T., Katada, T. and Matsubara, T. (1990) Eur. J. Biochem.. 194: 81-87.
- Tolbert, M.E.M., White, A.C., Aspary, K., Cuttss, J. and Fain, J.N. (1980) J. Biol. Chem. 255: 1938-1944.
- Torres-Márquez, M.E. and Moreno-Sánchez, R. (1991) Procc. West. Pharmacol. Soc (en prensa)
- Trejo, J.A. and Brown, J.H. (1991) J. Biol. Chem. 266: 7876-7882.
- Tsujimoto, G., Tsujimoto, A, Suzuki, E. and Hashimoto, K. (1989) Moll. Pharmacol. 36: 166-176.
- Uhling, R.J., Prpic, V., Jiang, H. and Exton, J.H. (1986) J. Biol. Chem. 261: 2140-2146.
- Uhling, R.J., Jian, H., Prpic, V. and Exton, J.H. (1985) FEBS Lett. 188: 317-320.
- Umekawa, H., and Hidaka, H., (1985) Biochem. Biophys. Res Comm. 132:56-62.
- U'Prichard, D.C., Charness, M.E., Robertson, D. and Snyder, S.S. (1978) Eur. J. Pharmacol. 50: 87-89.
- Vesperinas, G., Feddersen, M., Lewin, J. and Huidobro-Toro, P (1989) Eur. J. Pharmacol. 165: 309-313.
- Vilgrain, I., Defaye, G. and Chambaz, E.M. (1984) Biochem. Biophys. Res. Comm. 125: 554-561.
- Villalobos-Molina, R., Uc, M., Hong, E. and García-Sáinz, J.A. (1982) J. Pharmacol. Exptl. Ther. 222: 258
- Vincentini L.M., diVirgilio, F, Ambrosini, A., Pozzan T and Meldolesi, J. (1985) Biochem. Biophys. Res Comm. 127:

310-317.

- Vincentini, L.M., Ambrosini, A., DiVirgilio, F., Pozzan T., Meldolesi J. (1985) *J. Cell Biol.* 100: 1330- 1333.
- Volpe, P., Krause, K.H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J. and Lew, D.P. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1091-1095.
- Vuilliet, P.R., Woodgett, J.R., Ferrari, S. and Hardie, D.G. (1985) *FEBS Lett.* 182: 335-339.
- Wahl, M.I., Nishibe, S., Suh, P.G., Rhee, S.G. and Carpenter, G (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* 86: 1569-1572.
- Wallace, M. and Fain, J.N. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 9527-9530.
- Wange, R.L., Smrcka, A.V., Sternweis, P.C. and Exton, J.H. (1991) *J. Biol. Chem.* 266: 11409-11412.
- Welch, W.J. (1985) *J. Biol Chem* 260: 3058-3062.
- Werth, D.K., Niedel, J.E. and Pastan, I., *J. Biol Chem* 258: 11423
- White, J.R., Huang, C.K., Hill, J.M., Naccache P.H, Becker, E.L. and Sha afin R.F. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 8605-8611.
- Wilson, K.M., and Minneman, K.P. (1989) *J. Neurochem.* 53: 1782-1786.
- Wilson, D.B. and Minneman, K.P. (1990) *J. Biol. Chem.* 265: 17601-17606.
- Wilson, D.B., Brass, T.E., Hofmann, S.L. and Majerus, P.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 11718-11724.
- Wilson, D.B., Connolly, T.M., Bross, T.E., Majerus, P.W., Sherman, W.R., Tyler, A.N., Rubin, L.J. and Brown, J.E. (1987) *J. Biol. Chem.* 260: 13496-13501.
- Witters, L.A., Vater, C.A. and Lienhard, G.E. (1985) *Nature* 315: 777.
- Wood, C.L., Arnett, C.D., Clarke, W.R., Tsai, B.S. and Lefkowitz, R.J. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28: 1277-1282.
- Woods, N.M., Cuthberson, K.S.P. and Cobbold, P.H. (1987) *Biochem. J.* 246: 619-623.

- Wooten, M.W. and Wren R.W. (1984) FEBS Lett. 171: 181-186
- Yamaguchi, T., Nakata, H. and Fujiwara, H. (1981) J. Biol. Chem. 256: 5404-5409
- Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K, Castagna, M. and Nishizuka, Y. (1983) Biochem. Biophys. Res Comm. 112: 778-786.
- Yang-Feng, T.L., Xue, F., Zhang, W., Cotecchia, S., Frielle, T., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Franke, U. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1516-1520.
- Zwiller, J. Revel, M. and Malviya A.N. (1985) J. Biol. Chem. 260: 1350-1353.