

00581



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO ³

FACULTAD DE QUIMICA _{2a}

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR ALFA _{1B} ADRENERGICO
EN HEPATOCITOS DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

P R E S E N T A:

GLORIA GUTIERREZ VENEGAS



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

Esta tesis se realizó en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Asesor del Tema: Dr. J. Adolfo García-Sáinz.



Sustentante: Gloria Gutiérrez Venegas.



Para la obtención del grado de doctorado en Ciencias Químicas (Bioquímica) el trabajo se presentará ante el siguiente jurado:

Presidente: Dra. Irma Bernal Lugo.

Primer Vocal: Dra. Rocío Salceda.

Segundo Vocal: Dr. José Pedraza.

Tercer Vocal: Dr. Ruy Pérez Monfort.

Secretario: Dr. Alejandro Zentella.

Primer Suplente: Dr. Diego González.

Segundo Suplente: Dr. Fernando Montiel.

ESTE PROYECTO FUE APOYADO POR DGAPA (IN200193) Y CONACYT (0310-N9107)

"It's strange, isn't
That a man should have a consuming passion
To do something for which he lacks the capacity?"

T.S. Elliot.

A mi Padres y familia Raúl, José Antonio, Gabriela, Marta, Adriana, Santiago y José María y por supuesto a Manuel con enorme cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Adolfo García-Saíenz, alma y sustancia de este proyecto, mi más profundo agradecimiento.

A la Dra. Marina Macías Silva, cuya continua solidaridad y amistad fueron estímulos permanentes en el trabajo diario.

Al Lic. en Nutrición Fernando López Barrera, por la ayuda y enseñanza constante en el manejo de programas de computación. Y por su invaluable amistad.

A los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo.

A las Dras. Rosario Muñoz Clares y Victoria Chagoya de Sánchez por sus sugerencias en los exámenes tutoriales.

A mis compañeros Biol. Rocío Alcántara, Dra. Marta Robles, M en C. Claudia González, Biol. Alberto Olivares, Q.F.B. Teresa Romero, amigos diarios en el esfuerzo cotidiano.

A la Biol. María Teresa Lara, Patricia Casas, Dr. Gonzalo Arrarás, Agustín García, Artemio Mendoza con mis mejores deseos por el éxito de sus carreras.

A Guadalupe Ramírez por su incansable apoyo secretarial.

INDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
Historia.....	14
Clasificación y Farmacología.....	19
Antecedentes.....	39
OBJETIVOS.....	40
METODOS Y MATERIALES	41
RESULTADOS	42
RESUMEN DE RESULTADOS	43
DISCUSION.....	45
SUMMARY	50
BIBLIOGRAFIA.....	51

RESUMEN

En el presente trabajo se procedió a caracterizar el receptor α_1 adrenérgico en hepatocitos de pollo. En la fase inicial de la indagación se estudió la estimulación α_1 adrenérgica sobre el recambio de fosfoinosítidos, lo que nos permitió encontrar el siguiente orden de potencia para los agonistas: adrenalina = noradrenalina > fenilefrina. Con metoxamina no se observaron incrementos en el recambio. Utilizando antagonistas de acción irreversible se observó que el recambio de fosfoinosítidos se bloqueó con prazosina, mientras que la cloroetilclonidina inhibió parcialmente dicha respuesta. En cuanto a antagonistas de acción reversible se observó que la prazosina es más potente que el 5-metilurapidil para inhibir la acción de norepinefrina sobre el recambio de fosfatidil inositol. Resultados similares se obtuvieron tomando como parámetro la actividad de la fosforilasa a. Estos datos sugieren que el receptor α_1 adrenérgico corresponde al subtipo B. Todo lo anterior se confirmó al realizar estudios de competencia con prazosina tritlada en los que se encontró que el orden de potencia fue el siguiente prazosina > WB4101 > 5-metil urapidil.

Se sabe también que la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos genera como segundos mensajeros IP_3 y calcio y en ambos parámetros se observó que la noradrenalina estimula la producción de estos mensajeros y que sus acciones son inhibidas por 5-metilurapidil. En la cuantificación de IP_3 se observó además que la prazosina presenta mayor afinidad y potencia al bloquear las acciones de la noradrenalina. Los datos expuestos nos permiten concluir que en hepatocitos de pollo el receptor α_1 adrenérgico corresponde al subtipo B y finalmente que la proteína fijadora de nucleótidos de guanina acoplada a este sistema no es sensible a la toxina *pertussis*.

INTRODUCCION

Quizá no sería excesivo afirmar que uno de los secretos de la vida radica en la capacidad que tienen las células de comunicarse las unas con las otras. Se trata de un fenómeno universal, observado desde hace mucho tiempo y cuyas características y modalidades más sobresalientes han sido objeto de una larga y fascinante investigación científica. De hecho no sería posible imaginar siquiera la existencia de un organismo sin presuponer que todas sus partes se hallan íntimamente interconectadas, desde las más simples y primarias, que son las células, hasta los niveles superiores, que se hallan compuestos por agregados celulares y en última instancia forman los distintos órganos de que se compone la estructura general.

La necesidad de establecer un flujo de comunicación sólido y constante impulsó a la vida a crear una infinidad de métodos y sistemas destinados a graduar y modular los diversos mensajes que el organismo debe enviar a todo lo largo de su geografía fisiológica. Para cumplir con una empresa tan compleja, tan compleja que a veces se antoja imposible, la naturaleza debió inventar una serie de alternativas que le garantizaran un máximo de resultados con un mínimo de inversión energética. El primero y más común de estos recursos es el contacto directo entre las células, que tiene el objetivo fundamental de intercambiar materiales nutritivos y determinar la forma y rigidez de ciertos tejidos, pero que interviene también de forma decisiva en fenómenos tan cruciales como la diferenciación celular.

La elegancia y la complejidad del sistema mencionado en las líneas anteriores palidece, sin embargo, ante las estrategias de que se valen las células para comunicarse a larga distancia. Se trata, en este caso, de establecer una línea de mensajería permanente entre determinadas regiones del organismo y otros puntos, a veces muy distantes, en los que habrá de

efectuarse una función que a su vez generará señales que promoverán nuevas funciones en otras partes del propio organismo. Para cumplir con un designio de esta magnitud las células han creado un aparato de comunicación que, en esencia, se compone de mensajes y receptores de mensajes. Los primeros han sido clasificados, en primer término, teniendo en cuenta las distancias que deben recorrer para llegar al sitio en el que habrán de expresarse.

Las señales que pertenecen a este capítulo de la comunicación celular se denominan endócrinas, parácrinas y autócrinas. Las primeras de ellas se originan en el sistema endócrino y liberan unos mensajeros muy característicos, y muy caracterizados, que se denominan hormonas y cuyo efecto se produce en lugares alejados del sitio en el que fueron fabricadas. Las señales parácrinas, como los neurotransmisores y las neurohormonas, ejercen su efecto sobre células adyacentes o muy próximas al sitio en el que fueron liberadas, como sucede entre las células nerviosas o las células del tejido muscular. El tercer grupo de señales, por último, abarca, entre otros, a los factores de crecimiento, cuya función consiste en inducir un determinado cambio biológico en la misma célula donde se originó la señal.

El proceso de transmisión de cada una de estas señales se halla gobernado por una serie de pasos rigurosamente escalonados y de cuya coordinación y exactitud depende de manera eminente el buen éxito de cada mensaje. El primer afán de la célula se halla dirigido a fabricar las moléculas que habrán de desplazarse a lo largo del organismo para cumplir una función específica sobre las células destinadas a captar y elaborar el sentido del mensaje. Esta segunda parte del proceso se inicia sobre la superficie celular, donde la célula blanco, que es la destinataria del mensaje, tiene la capacidad de relacionarse con esos enviados del mundo exterior mediante un sistema de

receptores de naturaleza protéica que fueron producidos en el interior de la misma célula antes de ser exportadas, y enraizadas, en la membrana plasmática. El tercer paso se inicia en el momento en que el receptor interactúa con otra proteína de membrana que tiene funciones de acoplamiento. La molécula citada ejerce a su vez una serie de cambios químicos y morfológicos que se reflejan de modo gradual o instantáneo en el citoplasma activando, a su vez, a un grupo de efectores enzimáticos que darán lugar a lo que se llama el segundo mensajero, y que es una molécula que, en última instancia, habrá de llevar hasta sus consecuencias finales el propósito del mensaje original.

Es mucho, por fortuna, lo que la biología contemporánea ha logrado desentrañar sobre el origen, la estructura y las funciones de esas moléculas prodigiosas, los mensajeros. Se sabe, por ejemplo, que las hormonas no sólo pueden actuar en membrana plasmática sobre una proteína denominada receptor sino que algunas de ellas ejercen su efecto interactuando con receptores que se encuentran en el citoplasma debido a la facilidad con que pueden solubilizarse en un ambiente lipídico. Un ejemplo notable de esta clase de mensajeros son los esteroides, como en el caso de la progesterona y estrógenos, una de cuyas misiones consiste en estimular la producción de proteínas del huevo blanco en el pollo. Estas hormonas tienen la capacidad de interactuar con proteínas receptoras en el núcleo o en el citoplasma de la célula, lo que les permite acumularse en el interior del núcleo y alterar, de manera directa o indirecta, la transcripción del ADN. Estas hormonas pueden ser liberadas al torrente sanguíneo por diversas glándulas. La composición química de estas hormonas ha obligado a la naturaleza a crear un sistema de transporte fundado en una serie de proteínas llamadas transportadoras, para conducir las de la manera más oportuna y eficaz hasta su lugar de destino. La

vida media de estos mensajeros oscila entre los segundos y los días, igual que el efecto que pueden ejercer sobre sus células blanco.

Las hormonas solubles en agua, por su parte, tienen la facultad de interactuar con los receptores de la superficie de la membrana plasmática produciendo un efecto tan veloz que puede medirse en milisegundos y segundos. La acción de estas hormonas tiene el poder de generar, en el interior de la célula, una serie de compuestos de vida transitoria llamados segundos mensajeros, que tienen como función primordial acarrear el mensaje a otras partes de la célula para inducir una serie de nuevos efectos. Ejemplos de estas moléculas lo constituyen el monofosfato de adenosina cíclica (AMPC), el calcio y el inositol trifosfato, que participan en la modulación funcional de algunas enzimas y algunas proteínas no enzimáticas.

Las hormonas encargadas de activar la producción de estos segundos mensajeros pueden ser de naturaleza peptídica, como el glucagón, la angiotensina o bien pequeñas moléculas, como las catecolaminas, la adrenalina y noradrenalina, estas dos últimas moléculas mencionadas, son neurotransmisores del sistema nervioso simpático y la adrenalina es una hormona que actúa en tejidos periféricos (1,2,3). Las siguientes líneas estarán dedicadas a describir y analizar las propiedades de las catecolaminas, que son las hormonas en torno de las cuales giran las investigaciones realizadas en el presente trabajo.

Las catecolaminas, son aminas fenólicas dihidroxiladas cuya producción se localiza en el cerebro, la médula suprarrenal y en los restos ectópicos del tejido de la cresta neural (4). La adrenalina y la noradrenalina, que son dos de los miembros más notables de esta familia de moléculas, fueron detectadas por

primera vez en 1895, gracias a los trabajos importantísimos de Oliver y Schäfer (5), pero no fue sino cuatro años después cuando Abel (6) la bautizó con el nombre adrenalina, mismo que la ha hecho famosa y Slotz y Dakin (7) consumaron la hazaña de sintetizarla de modo independiente.

La ruta metabólica que lleva a la síntesis de estos compuestos se inicia con la tirosina, que es muy abundante en los tejidos humanos y que, además de ser ingerida en la dieta, puede ser sintetizada en el hígado al efectuarse la parahidroxilación de la fenilalanina mediante la acción de la fenilalanina hidroxilasa. El organismo de los animales superiores ha diseñado un sistema muy eficaz para regular la producción de las catecolaminas, el cual se lleva a cabo mediante la concentración local de la tirosina en el tejido cerebral. No ha sido sino en fechas recientes cuando los investigadores lograron observar las sutilezas de este mecanismo de síntesis y regulación que de manera tan fundamental afecta el buen funcionamiento de un organismo. Según ha venido a desentrañarse la acumulación de la norepinefrina inhibe de modo competitivo la síntesis de tirosina en relación con la 5,6,7,8- tetrahidrobiopterina, que es un cofactor, y de modo no competitivo en relación con su sustrato, que es la fenilalanina (4).

La fase final de la síntesis de las catecolaminas presupone una serie de pasos muy finos, pero los más importantes son los que van de la metahidroxilación de la tirosina a la 4,5 dihidroxifenilalanina (DOPA), la decarboxilación de la DOPA a dopamina y la β hidroxilación de la dopamina a norepinefrina. Aunque algunos investigadores han propuesto la existencia de una serie de vías alternas para la producción de las moléculas que nos ocupan, ninguno de ellos ha demostrado, hasta la fecha y de modo concluyente, que las síntesis del compuesto se verifique a través de una ruta distinta a la que se ha descrito (4).

Es importante hacer notar que la velocidad de la síntesis se halla regulada por lo general atendiendo a las condiciones específicas del órgano implicado, que en algunos casos acelerará o frenará la intensidad del proceso así como el ritmo y los modos en que habrá de efectuarse la captación y la liberación de las moléculas para que ejerzan su función en los sitios adecuados. En realidad, es a partir de esta fase del proceso general cuando las catecolaminas, en cualquiera de las modalidades señaladas, empiezan a cobrar una importancia decisiva en el marco de la economía corporal, pues una vez que se liberan al torrente sanguíneo habrán de implementar al organismo con una serie de reacciones y funciones que en última instancia se hallan íntimamente vinculadas a la aventura procelosa de la supervivencia.

El viaje de las moléculas a través de la sangre, sin embargo, no es más que la parte inicial de ese milagro fisiológico del que dependen, entre otras cosas, el pulso cardíaco, la presión sanguínea, el tono vasomotor y una serie muy importante de rutas y transformaciones metabólicas. Lo primero que deben hacer las hormonas al llegar a su puerto de destino es hacer contacto con el órgano en el que habrán de manifestarse. El desembarco tiende a ser muy específico y en todos los casos se produce mediante la intervención de una molécula proteica que se halla anclada en la superficie de la célula y que ha sido fabricada previamente con el móvil exclusivo de enganchar al mensajero y convertirse en la primera instancia del proceso que habrá de culminar en el interior de la propia célula una vez que el sentido del mensaje se haya interiorizado obedeciendo a una serie de pasos más o menos complejos.

No es de extrañar, por tanto, que la estructura y naturaleza biológica de estas anclas prodigiosas hayan sido objeto de los estudios más rigurosos y exhaustivos durante los últimos años. El área de la que nos ocuparemos en las

siguientes líneas pertenece a los llamados receptores adrenérgicos, o adrenoceptores, que tienen como misión exclusiva captar y transmitir al interior de la célula y al núcleo el mensaje de la epinefrina y la norepinefrina, que son, tal vez, las catecolaminas más estudiadas en la biología contemporánea.

HISTORIA

El misterio de los receptores adrenérgicos, o adrenoceptores, empezó a ser develado en 1948, cuando Ahlquist (8) percibió una serie de anomalías en el comportamiento de ciertas aminas simpatomiméticas cuya actividad no podía ser explicada según las hipótesis prevalecientes en el momento en que inició su indagación. Lo primero que advirtió es que había una serie de catecolaminas de estructura muy parecida que al entrar en contacto con tejidos diferentes exhibían un orden de potencia y una actividad distintas, lo que debía atribuirse a las diferencias estructurales de los compuestos. Sin embargo, cuando el orden de potencia difería entre un tejido y otro no era posible atribuir la disparidad a la causa mencionada sino al hecho muy probable de que la diferencia se hallara radicada en la estructura de los receptores, que desde un principio parecieron estar repartidos en dos clases fundamentales: la primera, que tenía efectos básicamente estimulatorios pero que también incluía propiedades inhibitorias en tejido intestinal, fue bautizada con la letra α . La segunda, que fue bautizada con la letra β , tenía efectos puramente inhibitorios, con excepción de los que ejercía en el tejido cardíaco. Esta diferencia fisiológica, que era desconocida para la mayor parte de los investigadores, se mantuvo en calidad de hipótesis durante un cierto tiempo y no pasó a ocupar el nicho de las cosas verificadas sino en el momento en que surgió la era de los β bloqueadores abriendo un campo insospechado a los trabajos que se estaban haciendo en todo el mundo alrededor de las funciones y las características esenciales de los receptores adrenérgicos.

El campo de los receptores adrenérgicos se ensanchó de modo significativo en 1967, cuando H. Lands (9) propuso la existencia de dos tipos de receptores β (β_1 y β_2), lo que pudo distinguirlos fue al efectuarse estudios farmacológicos probados frente a doce diferentes agonistas, que son moléculas que poseen la facultad de acoplarse al receptor, activarlo y transmitir una señal al interior del citoplasma. Los receptores antes mencionados abandonaron el reino de lo hipotético en ese mismo año, cuando Furchgott (10) también reportó la presencia de varios tipos de receptores β adrenérgicos en diversos tejidos aislados, mediante el uso de antagonistas selectivos, que son unas moléculas dotadas de la facultad singular de unirse a un receptor sin activarlo. Los antagonistas pueden ser clasificados obedeciendo a la índole de sus acciones, que tienen la capacidad de ser reversibles o irreversibles. Si el antagonista se une al sitio activo para el agonista, los antagonistas reversibles son competitivos y los irreversibles serán no competitivos.

La clasificación de los receptores α , que empezó a florecer en 1957, tuvo un desarrollo más lento y azaroso, porque se encontraban ubicados en la sinapsis y en la postsinapsis del tejido nervioso, lo que hacía más complicado el estudio en cuestión. Algunos de los estudios más interesantes sobre el particular fueron realizados por Brown y Gillispie (11), que observaron el flujo de noradrenalina causada por la estimulación nerviosa en el bazo y encontraron que al adicionar un antagonista α_2 adrenérgico se incrementaba el flujo de catecolaminas, en especial el de la noradrenalina.

Las observaciones anteriores sirvieron de arranque a la deducción, por parte de Langer (12), de que los receptores α podían ser objeto de una subclasificación fundamentada en su localización anatómica. A los receptores que se hallaban localizados postsinápticamente se les denominó α_1 y se pensó

que tenían funciones excitatorias. A los receptores ubicados en la presinapsis se les llamó α_2 y se les adjudicó funciones inhibitorias.

El siguiente gran paso en la evolución teórica y experimental de los receptores adrenérgicos lo dieron Berthelsen y Pettinger (13), que propusieron, mediante el uso de fármacos, la existencia de receptores α , que fueron detectados según su grado de respuesta frente a varios agonistas adrenérgicos. Los investigadores mencionados decidieron clasificarlos por su selectividad farmacológica.

La hipótesis anterior fue verificada mediante el desarrollo de ligandos radioactivos que permitían la asociación específica a diferentes tipos de receptores. Es importante mencionar que la interacción efectuada entre estos componentes presenta también gran afinidad, trabajo de gran mérito que desarrollaron, en 1976, Williams y Lefkowitz (14). El estudio referido se hizo utilizando ergocriptina radioactiva con alta afinidad para asociarse de manera no específica a los dos subtipos de receptores adrenérgicos.

Las investigaciones realizadas por estos autores son de tal importancia que sería imposible estudiar la estructura y el mecanismo de un receptor sin recurrir a los estudios de asociación. El ligando radioactivo, herramienta imprescindible de estas indagaciones, debe tener la facultad de interactuar con el receptor de manera reversible y con alta afinidad para formar el complejo ligando receptor. La interacción referida ha permitido desarrollar tres modelos experimentales: saturación, inhibición y cinética (15).

A continuación se hará una reseña sumaria de cada uno de estos modelos:

Diremos, en principio, que en los estudios de saturación es necesario efectuar la incubación de los receptores en concentraciones fijas y la del ligando radioactivo en concentraciones variables. El análisis de los datos obtenidos en este experimento nos proporciona la siguiente información: asociación máxima (B_{max}) que determina el número total de receptores disponibles. De esta manera se obtiene también la constante de disociación (K_d), que es la concentración de radioligando que se necesita para ocupar la mitad de los sitios receptores, lo que sirve para establecer la afinidad del receptor por el radioligando.

En los estudios de inhibición las concentraciones del ligando y los receptores son constantes y se adicionan concentraciones crecientes de un fármaco no radioactivo. La concentración de la droga no marcada (o del ligando no radioactivo) que inhibe el 50% de la acción del ligando radioactivo se denomina constante de inhibición 50 (IC_{50}) y de esta manera determinar la afinidad del ligando no radioactivo por el receptor.

En el tercer tipo de experimento, que es cinético, se determina la interacción entre el receptor y el ligando radioactivo en función del tiempo. De este modelo experimental se obtienen las constantes de asociación (k_+1) y las constantes de disociación (k_1). La relación de estas dos constantes nos va a proporcionar la constante de disociación en equilibrio (K_d). El experimento descrito es de suma importancia porque permite que los experimentos de saturación e inhibición se lleven a cabo en condiciones de "Steady State", es decir que la asociación del ligando radioactivo al receptor sea reversible.

Desafortunadamente es poco lo que se ha logrado avanzar en el establecimiento de la interacción específica entre el receptor y las catecolaminas, pero es importante mencionar que los estudios de mutagénesis

en conjunto con los análisis farmacológicos han sido una herramienta de inestimable utilidad.

Los primeros resultados de estos estudios se han obtenido para el receptor β_2 adrenérgico en donde se encontró que el carboxilo del residuo de aspartato localizado en la tercera asa hidrofóbica es la responsable de interaccionar con el nitrógeno de las catecolaminas. Este dato es un avance inicial de gran importancia para el conocimiento de la interacción entre el receptor y los fármacos, que nos permitirán comprender cual es el aminoácido específico que produce las diferencias en afinidad de los receptores por los diversos agonistas o antagonistas utilizados en los ensayos de referencia (15a).

Es preciso destacar también la importancia indudable de los hallazgos de Fain y García Sañz (16), quienes sugirieron que los receptores α_1 estaban implicados en la elevación de calcio intracelular y en los incrementos de fosfatidil inositol y por contraste los receptores α_2 estaban implicados en la inhibición de la adenilato ciclasa. Las indagaciones de Fain y García Sañz estuvieron basadas en el análisis de la respuesta bioquímica de los receptores y no solamente en criterios farmacológicos.

Los datos obtenidos por estos investigadores cambiaron de manera determinante el estudio de las acciones y funciones de los receptores debido a que exploraban la posibilidad de caracterizar las interacciones receptor-fármaco y la respuesta bioquímica inicial, lo que propició que pasaran a segundo término las determinaciones fisiológicas que resultaban ser un evento muy distante en relación al estímulo inicial.

Es interesante hacer notar que los trabajos que se han mencionado fueron precedidos por las ideas de Sabol y Nirenberg (17), que en 1979 propusieron que en las células derivadas del neuroblastoma la respuesta α adrenérgica se hallaba acoplada en forma negativa a la adenilatociclasa. En 1978, por su lado,

Jones y Mitchell (18) encontraron que la activación del receptor α_1 adrenérgico se hallaba acoplado a la elevación de calcio y a la movilización de fosfoinosítidos.

Los datos que se han sintetizado a lo largo de las últimas líneas sirvieron de base para realizar una exploración más concienzuda y enérgica de los receptores adrenérgicos, que con el correr del tiempo fueron adquiriendo un perfil cada vez más definido hasta desembocar en la caracterización bioquímica y molecular que terminó por subdividirlos en tres tipos: α_1 , α_2 y β (β_1 , β_2 y β_3) (Tabla I).

CLASIFICACIÓN Y FARMACOLOGÍA

En fecha reciente, y como resultado de una serie de estudios de biología molecular, se han clonado y caracterizado diez subtipos de los receptores adrenérgicos. Es pertinente decir, sin embargo, que la estructura primaria de estas proteínas receptoras exhibe una gran similitud. Todas ellas disponen de siete dominios transmembranales y presentan siete regiones de aminoácidos hidrofóbicos que les permiten atravesar la membrana plasmática. El extremo amino terminal y tres asas hidrofílicas se extienden en un segmento extracelular mientras que el segmento donde se halla alojado el carboxilo terminal se localiza en la parte interior de la célula (19,20).

La disposición topográfica de estos receptores fue confirmada mediante estudios efectuados para la bacteriorrodopsina y para la rodopsina, debido a que estas proteínas son susceptibles de ser purificadas con facilidad gracias a la abundancia con que se hallan distribuidas en las células correspondientes (21). Los estudios, que fueron muy minuciosos, se perfeccionaron con el empleo de técnicas de microscopía electrónica. Un modelo similar se ha sugerido para

TABLA FAMILIA DE RECEPTORES ADRENERGICOS

SUBTIPO	TAMAÑO	INTRONES	LOCALIZACION	POTENCIA		DISTRIBUCION	PROTEINA G	EFECTOR
				AGONISTA	ANTAGONISTA			
β_1	477	0	10q24-q26	ISO>NA \supset AD	BETAX \supset ICI11855	CORAZON, PINEAL	G_s	↑ ADENIL CICLASA
β_2	413	0	5q31-q33	ISO>AD>NA	ICI118551>BETAX	PULMON, PROSTATA		↑ CANAL Ca^{2+}
β_3	402	0	-	NA>ISO>AD	ICI118551>>ALP	TEJIDO ADIPOSO		
α_{2A}	450	0	10q24-q26	OXY>>AD \supset NA	YOH>>PRAZ	AORTA, CEREBRO	G_i	ADENIL CICLASA
α_{2B}	450	0	2	OXY=AD> \supset NA	YOH>>PRAZ	HIGADO, RIÑON		↑ CANALES K^+ , Ca^{2+}
α_{2C}	461	-	4	OXY=AD> \supset NA	YOH>PRAZ	CEREBRO		INTERCAMBIO Na^+ - H^+
								↑ FOSFOLIPASA C, A_2
α_{1A}	-	-	-	AD \supset NA I	WB4101=PRAZ	VASOS DEFERENTES, CEREBRO	G_n	↑ FOSFOLIPASA C
α_{1B}	515	1	5q32-q34	AD \supset NA II	PRAZ>WB4101	HIGADO, CEREBRO		↑ CANAL Ca^{2+}
α_{1C}	466	1	8	AD \supset NA III	PRAZ>WB4101	BULBO OLFATORIO		↑ FOSFOLIPASA A_2
α_{1D}	560	-	20p13	NA \supset AD>OXY	PRAZ \supset WB4101	VASOS DEFERENTES, CEREBRO		↑ FOSFOLIPASA D

I AD>A>METOX
 II AD=NA>>METOX
 III NA>A>>METOX

ISO: ISOPROTERENOL
 A: ADRENALINA
 ALP: ALPRENOLOL

YOH: YOHIMBINA
 NA: NORADRENALINA
 BELAX: BETAXANOL

OXY: OXIMETAZOLINA
 PRAZ: PRAZOSINA

los receptores adrenérgicos con estudios de mutagénesis dirigida y anticuerpos generados contra fragmentos específicos del receptor β_2 adrenérgico (22,23).

Se ha logrado así mismo purificar los receptores y reconstituirlos con sus proteínas G en vesículas de fosfolípidos. Por otra parte se han realizado estudios de modificaciones covalentes, mutagénesis dirigida y construcción de receptores quiméricos, lo que ha permitido estudiar de modo extenso la función y regulación de los receptores adrenérgicos (24).

Los receptores en cuestión presentan entre veinte y veintiocho aminoácidos hidrofóbicos que les permiten atravesar la membrana plasmática en conformación de α hélice. Estos dominios transmembranales presentan una gran identidad entre todos ellos, llegando, como en el caso de la familia de los β adrenérgicos, a un índice de similitud cercano al 70 por ciento. Por otro lado si comparamos las analogías entre un receptor β y uno α -adrenérgico, la identidad entre los segmentos transmembranales disminuye hasta llegar a un 45 por ciento. Es preciso subrayar, sin embargo, que las regiones que presentan menor identidad son el extremo amino terminal, la tercera asa citoplásmica y el carboxilo terminal, debido a que son muy variables tanto en longitud como en composición (19,25-27).

Los receptores son muy similares en la primera y segunda asa intracelular, así como en uno o más sitios de glicositación cerca del amino terminal y los sitios de fosforilación en la porción citoplásmica. Se ha observado también que las asas extracelulares contienen varios residuos de cisteína que permiten la formación de enlaces disulfuros que estabilizan la interacción entre el receptor y su ligando.

Todos los receptores que se han venido reseñando se acoplan a proteínas fijadoras de nucleótidos de guanina (también llamadas proteínas G) y a una serie, también diferente, de efectores. En los párrafos siguientes se hará una breve descripción de estos receptores adrenérgicos en relación al sistema de transducción al que se hallan acoplados y su emplazamiento en el entorno celular.

Empezaremos por decir que los receptores β se han determinado en una gran variedad de tejidos, entre los que se encuentran el hígado, el corazón, el pulmón y el tejido adiposo.

Se ha determinado que los receptores β_1 son activados con la misma potencia por la adrenalina y la noradrenalina. En otra serie de determinaciones se observó también que en los receptores β_2 la adrenalina presentaba mayor potencia en relación a la noradrenalina (28). Utilizando diversos antagonistas para su estudio se encontró que el betoxamol es más potente que el ICI-1855 en bloquear las acciones de la respuesta β_1 . La potencia de estos agentes se invierte cuando se trata del receptor β_2 adrenérgico (29).

Recientemente, al estudiar tejido adiposo, Emorine y colaboradores (25) encontraron un subtipo adicional de receptor β al que denominaron β_3 . Se observó que noradrenalina es más potente en activar a este receptor en comparación a la adrenalina y que ciertos fármacos, que para los otros receptores β hubieran funcionado como antagonistas, como el CGP-12 177, oxprenolol y pindolol, funcionaban como agonistas parciales. Se sabe también que, en la fase previa a la diferenciación de los adipocitos, se presentan únicamente los receptores β_1 y que durante el proceso de diferenciación se incrementan cinco veces los niveles de RNA mensajero del subtipo β_3 y se detecta una señal correspondiente a los receptores β_2 adrenérgicos.

El primer gen de los receptores β que fue clonado y secuenciado correspondió al subtipo β_2 (30). Los resultados mostraron fundamentalmente que está constituido por cuatrocientos trece aminoácidos y su colocación en el cromosoma humano es la 5q31q33. Se ha establecido también que para este receptor la tercera asa intracelular es la responsable de provocar la interacción entre el receptor y la proteína fijadora de nucleótidos. Los receptores β_1 están integrados por cuatrocientos setenta y siete aminoácidos y se localizan en el cromosoma número 10q24q26. Diremos por último que el receptor β_3 está formado por cuatrocientos dos aminoácidos y su localización en el genoma humano permanece sin ser elucidada.

Se ha demostrado, por otra parte, que los agonistas que interaccionan con los receptores β son capaces de elevar los niveles de AMPc (figura 1). En la década de los setenta Rodbell y colaboradores (31-33) observaron que se requiere GTP para la activación hormonal de la adenilato ciclasa, lo que llevó posteriormente a la purificación de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina a la que por convención se ha denominado Gs. La proteína en cuestión fue clonada por Gilman y colaboradores (34-36), quienes pusieron en claro que la molécula tenía tres subunidades asociadas (α , β y γ) en un orden decreciente de peso molecular.

El mecanismo fisiológico de la proteína Gs exhibe una serie de particularidades en extremo interesantes. Al principio, en los instantes que anteceden a la irrupción del estímulo, se halla estable en su conformación trimérica original. En esta primera fase el fragmento α permanece vinculado a una molécula de difosfato de guanosina (GDP) y el receptor correspondiente se halla íntimamente ligado a la proteína G en un estado de alta afinidad para recibir al agonista. En el momento en que se produce la interacción entre el agonista y el receptor el GDP se intercambia por trifosfato de guanosina (GTP)

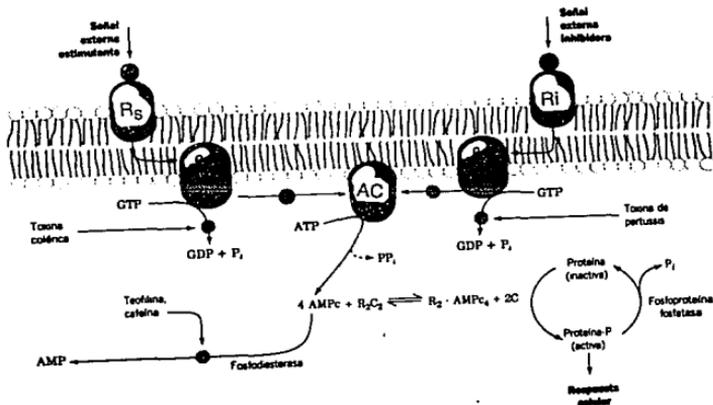


Fig. 1 Mecanismos de inhibición/estimulación a la adenilato ciclasa mediada por receptor.

La hormona al interactuar con el receptor (izquierda) produce la disociación de la proteína Gs. La subunidad α -GTP estimula a la adenilato ciclasa para que hidrolice el ATP a AMPc. La interacción de la hormona a un receptor inhibitorio (derecha) disminuye los niveles de AMPc a través de una proteína Gi.

La proteína cinasa A (R_2C_2) al ser activada se disocia y la interacción del dominio regulador al AMPc (R_2 -AMPc), libera al fragmento catalítico C2 y fosforila diversas proteínas celulares.

Tomado de VOET, D. y VOET, G.J.. Bioquímica (1992) Ed. Omega pag. 1249.

dejando en libertad al complejo $\beta\gamma$ y al receptor en un estado de baja afinidad. El siguiente paso de este mecanismo sutil produce la Interacción α s-GTP que, a su vez, tiene la capacidad de activar al efector, que en este caso es la adenilato ciclasa. Por su lado la subunidad α s tiene la facultad complementaria de ejercer funciones de GTPasa hidrolizando al GTP en GDP. Y cuando, por último, la subunidad α haya hidrolizado al GTP estará en posibilidad de asociarse otra vez al complejo $\beta\gamma$ y al receptor para regresar a un estado de alta afinidad (37-39).

Además de estimular la acción de la adenilato ciclasa se ha observado que la subunidad α s es la responsable también de la activación de canales de calcio sensibles a dihidropiridinas (40,41). La subunidad referida tiene así mismo la capacidad de actuar como sustrato de ciertas toxinas bacterianas que tienen actividad de ADP-ribosil transferasa, como ocurre con la toxina del cólera, lo que promueve la disociación del complejo α de $\beta\gamma$ dejando a la unidad referida en un estado de actividad permanente sobre la adenilato ciclasa (42).

Las indagaciones efectuadas en este campo durante los últimos años pusieron en evidencia que la adenilato ciclasa es una enzima que presenta una enorme heterogenidad. Hasta la fecha se han clonado y secuenciado ocho isoenzimas que fueron denominadas, siguiendo el orden de su descubrimiento, utilizando números romanos. Todas estas isoenzimas son estimuladas por la subunidad α de las proteínas Gs y las formas I y III han mostrado además ser estimuladas por la proteína fijadora de calcio denominada calmodulina. Cada una de estas isoenzimas poseen doce dominios transmembranales (42-45), y tienen el extremo amino y el carboxilo terminal, en todos los casos, orientado hacia el ámbito intracelular. La enzima hidroliza el trifosfato de adenosina (ATP) para formar una molécula de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), que a su vez se unirá a la proteína cinasa A, como paso indispensable a su fase de activación. La proteína cinasa A es un tetrámero asimétrico inactivo, formado

por dos subunidades regulatorias y dos catalíticas. La unión del AMPc a la subunidad regulatoria provoca la disociación de un dímero de subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas en forma de monómeros. La subunidad catalítica promueve la fosforilación covalente de diversas proteínas en residuos de serina y treonina. Se han caracterizado también dos formas de proteína cinasa A, a las que se ha denominado tipo I y tipo II (46-48).

Se ha establecido que la proteína cinasa A tiene la propiedad de regular la síntesis y la degradación del glucógeno, lo que efectúa fosforilando a la glucógeno sintetasa convirtiéndola en una molécula menos activa. La proteína cinasa A, así mismo, fosforila y activa a otra proteína cinasa denominada glucógeno fosforilasa cinasa que, a su vez, fosforila y activa a una tercera enzima denominada glucógeno fosforilasa, que tiene como misión específica degradar al glucógeno convirtiéndolo en glucosa 1-fosfato. Por otro lado la glucosa 1 fosfato puede ser convertida, mediante la acción de una fosfoglucomutasa a glucosa 6-fosfato, que será el metabolito destinado a originar la cascada de reacciones que integran a la turbina glucolítica en el ámbito muscular. En el hígado, además, la glucosa 6 fosfato es hidrolizada a glucosa para ser secretada posteriormente al torrente sanguíneo (3).

Las indagaciones de los últimos años en este campo fascinante han mostrado también que la proteína cinasa A es capaz, junto a las funciones que se han reseñado, de regular su propio sistema mediante la fosforilación del receptor β_2 adrenérgico impidiendo su acoplamiento con la proteína Gs (49,50). Este fenómeno se conoce como desensibilización, debido a que la activación prolongada de una célula con la hormona provoca una respuesta cada vez más reducida en los estímulos subsecuentes. Es importante señalar que en el proceso de desensibilización participan otras enzimas igualmente decisivas. (51,52).

El sistema de la adenilato ciclasa, que se activa según los pasos expuestos en las líneas anteriores, tiene así mismo la propiedad fisiológica de ingresar en fase de inhibición mediante el funcionamiento de una serie de mecanismos cuyos rasgos fundamentales serán detallados a continuación (figura 1). La bioquímica actual les ha dado el nombre de receptores α_2 adrenérgicos y según se verá en un momento se hallan implicados en una gran variedad de tejidos, incluyendo plaquetas, cerebro, bazo, pulmones, hígado, riñón, corazón e islotes pancreáticos y son responsables de mediar la agregación plaquetaria e intervenir en la liberación de neurotransmisores y participar en los procesos de vasoconstricción.(53)

Hasta el día de hoy se han descrito cuatro diferentes subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos, denominados α_2A, B, C y D . El primer gen de los receptores α_2 que logró aislarse se obtuvo de plaquetas humanas (53). Se hallaba localizado en el décimo cromosoma, por lo que recibió el nombre inicial de α_2C10 . El receptor está constituido por cuatrocientos cincuenta aminoácidos y en la actualidad ha sido rebautizado con el nombre de α_2A . El otro subtipo de receptor, el α_2B , (55) se localizó inicialmente en el cromosoma 2 y está constituido también por cuatrocientos cincuenta aminoácidos y no presenta aminoácidos glicosilados (56). Se ha detectado en hígado, riñón y pulmón (57). El tercer espécimen de estos receptores se localizó en el cromosoma 4, por lo que inicialmente se denominó α_2-c4 y en la actualidad se conoce como α_2C . Está constituido por cuatrocientos cincuenta y ocho aminoácidos y fue detectado en células de neuroblastoma. El último subtipo de receptor perteneciente a esta serie, el α_2D , cuya localización cromosómica no se ha definido con certeza, pertenece sin embargo a esta misma familia en virtud de sus rasgos y características farmacológicas. Se ha localizado en glándulas submaxilares y pineal de bovino. Es preciso destacar que la topografía celular de los receptores α_2A, B y C es muy similar, ya que los tres tienen un asa intracelular

relativamente larga y una región carboxilo terminal larga y los dominios membranales presentan similitud de hasta un 75 %, lo que nos hace suponer que a pesar de ser entidades autónomas las tres moléculas son homólogas y tienen un origen evolutivo similar (58).

Las indagaciones en el campo que nos ocupa han venido a demostrar que la respuesta α_2 provoca decrementos en la actividad de la adenilato ciclasa y en muchas ocasiones puede tener otros efectos relevantes, como la activación de canales de potasio (59), inhibición de corrientes de calcio (60), incremento en la actividad del intercambiador sodio-protón (61) y movilización de calcio intracelular (62). La proteína G encargada de mediar estas acciones se ha denominado G_i y a la fecha se han caracterizado tres diferentes formas de esta proteína, a las que se ha denominado 1, 2 y 3. Se trata también de proteínas heterotríméricas constituidas por las unidades α , β y γ . La subunidad α_1G_i tiene un peso molecular de 41 kDaltones y se ha caracterizado por ser muy abundante en el cerebro. La α_2G_i , con un peso molecular de 40 kDa participa, según hipótesis recientes, en la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa. La α_3G_i , proteína de 41kDa, de secuencia diferente, está comprometida principalmente en la regulación de los canales de potasio (63-66).

No se sabe aún con certeza cuál es el mecanismo mediante el cual subunidad α_1 participa en la inhibición de la adenilato ciclasa. Pero se ha propuesto que es la responsable de inhibir a la ciclasa. Otras evidencias, sin embargo, sugieren que al disociarse α de $\beta\gamma$ se incrementa la concentración de este dímero quedando en posibilidad de asociarse a subunidades α estimuladoras y bloquear de esta manera la activación de la adenilato ciclasa (35,67).

Hacia 1981 García Saíenz y cols. (68) y Ui (69) encontraron que al inyectar toxina *pertussis* a hamsters la respuesta α_2 adrenérgica registraba una notable

disminución y fue así como se descubrió que la subunidad α_1 era sustrato de la toxina *pertussis* agente causal de la tosferina. El efecto descrito se desarrolla mediante la ADP-ribosilación en un residuo de cisteína ubicado cerca del carboxilo terminal. La modificación que se produce sobre la subunidad α_1 , es de tal naturaleza que llega a impedir sus funciones inhibitorias sobre la ciclasa. A pesar de la gran cantidad de datos nuevos y de avances innegables en el estudio de la respuesta α_2 -adrenérgica aún quedan muchos esfuerzos por realizar para desentrañar con exactitud la relevancia fisiológica de esta respuesta.

El último tipo de receptor adrenérgico, y que es el tema básico de esta tesis, corresponde al subtipo α_1 . El grupo al que nos vamos a referir de aquí en adelante se halla distribuido de una manera muy extensa en todo el organismo y se ha reportado en forma preponderante en el corazón, en músculo liso, hígado, bazo y terminales nerviosas. La activación de este receptor se produce a través de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina (Gq), que a su vez activa a la fosfolipasa C que genera dos segundos mensajeros: inositol trifosfato y diacilglicerol (figura 2).

El desarrollo teórico del receptor α_1 , que se ha venido explorando en las líneas precedentes, recibió un impulso extraordinario gracias al empleo de ligandos radioactivos, instrumentos que permitieron efectuar estudios de asociación destinados a caracterizar respuestas bioquímicas y farmacológicas. Los primeros antagonistas que se utilizaron fueron [^3H] Dihidroergocriptina (DHE) (14) y [^3H] WB4101 (70), ligandos que entraron en acción tiempo antes de que se hubieran detectado las diferencias entre la respuesta α_1 y α_2 adrenérgica, pues los agentes mencionados carecían de especificidad necesaria para asociarse de modo selectivo a los subtipos de receptores a que se ha hecho referencia. En fechas posteriores se sintetizaron dos nuevos

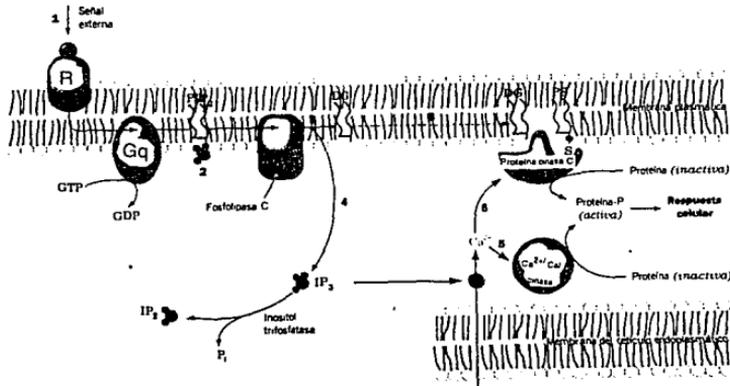


Fig. 2 Mecanismo de transducción de Fosfoinosítidos-Calcio.

La hormona al interactuar con el receptor (R) a través de una proteína Gq activa a la fosfolipasa C, enzima responsable de catalizar la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) a inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DG). El IP₃ moviliza el calcio de retículo endoplasmático y con DG activan a la proteína cinasa C, esta enzima requiere como cofactor fosftidilserina (PS)

Tomado de VOET, D. y VOET, G.J., Bioquímica (1992) Ed. Omega pag. 1254.

antagonistas radioactivos que vinieron a llenar el vacío existente: la [^3H] prazosina (71) y el [^{125}I] HEAT (72). La prazosina tritlada reúne todas las características necesarias para ser un excelente antagonista α_1 adrenérgico. Presenta alta afinidad, un grado mínimo de asociación no específica y sitios de asociación de una sola clase. El HEAT, por su lado, presenta varias ventajas sobre la prazosina, siendo su actividad específica la más significativa, pues se ha reportado que es hasta 30 veces superior al otro fármaco, lo que permite utilizarlo en los casos en que la cantidad de tejido es limitante o el número de receptores muy pequeño.

El surgimiento de estos ligandos ejerció un influjo maravilloso sobre el ensanchamiento del campo, creando, casi de golpe, expectativas muy promisorias. En 1980, por ejemplo, Le Clerq y colaboradores (73), utilizando como modelo de estudio el cerebro de rata, observaron que la respuesta α_1 adrenérgica presentaba diferente sensibilidad al tratamiento con el antagonista cloroetilclonidina. Los datos obtenidos por este grupo estimularon a otros investigadores a estudiar la respuesta α_1 y debieron transcurrir seis años antes de que Morrow y Creese, realizando estudios de asociación con los antagonistas WB4101 y fentolamina en membranas de corteza cerebral de ratas, encontraran que la asociación de estos fármacos al receptor α_1 presentaba un comportamiento bifásico. Semejante observación les llevó a sugerir que la población de receptores que presentaban alta afinidad por el antagonista se denominaran α_{1A} y a la población de receptores de baja afinidad se le denominó α_{1B} (74).

Desde el momento en que se lanzó al mundo la idea de la existencia de una población heterogénea de receptores α_1 comenzaron a sintetizarse una infinidad de agentes farmacológicos destinados a enriquecer el panorama de la investigación en el campo que nos ocupa. Entre los agentes más destacados se

encuentra la cloroetilclonidina, cuyas propiedades químicas específicas le permiten alquilar al receptor α_1 -adrenérgico. El compuesto fue utilizado por Han, en 1987 (75), en membranas de hipocampo. Incursionando en otros tejidos el mismo grupo de investigadores encontró que el WB4101 y benoxatán mostraban una enorme potencia en aquellos tejidos que no eran inactivados por la cloroetilclonidina (76). Los datos obtenidos a través de esta línea experimental apoyaban la idea de la existencia de una serie de subtipos de receptores α_1 adrenérgicos. Posteriormente se sintetizó el 5-metilurapidil y en fecha reciente la niguldipina, (77) que se mostraron muy afines al receptor α_{1A} adrenérgico. La espiperona (78), por su lado, se utilizó en glándulas submaxilares de rata y mostró una alta afinidad por los receptores α_{1B} adrenérgicos.

Otro grupo de investigadores, en 1985 (79), reportó que al utilizar metoxamina en hepatocitos de rata el agente tenía propiedades de agonista parcial, mientras que en aorta de conejo funciona como un agonista eficiente, lo que les llevó a suponer que en estos tejidos se expresaban diferentes tipos de receptores. En épocas más recientes, en el laboratorio del doctor García Sainz, se logró caracterizar el subtipo de receptor α_1 en hepatocitos (80) y adipocitos de rata (81). Los datos obtenidos mostraron que los receptores detectados pertenecían al subtipo B y en aorta de conejo al subtipo A (79). Los datos anteriores fueron obtenidos mediante la determinación de las acciones de prazosina y 5-metilurapidil, lo que demostró que el primer fármaco mencionado presenta mayor afinidad en bloquear las acciones de noradrenalina sobre el recambio de fosfoinosítidos en hepatocitos y adipocitos de rata.

La investigación en el campo de los receptores adrenérgicos recibió un nuevo e importante impulso cuando, años después, el grupo de Lefkowitz apartir de la purificación del receptor α_{1B} que obtuvo de la línea celular de músculo liso

de Hamster (DDT1 MF-2) logró clonar y secuenciar el receptor que se han venido mencionando (82). Los resultados anteriores, además, fueron (82-84) enriquecidos cuando el propio grupo caracterizó un subtipo adicional al que denominó α_1C . A continuación se hará una descripción de los datos más relevantes que se obtuvieron mediante experimentos de biología molecular para definir y caracterizar a cada uno de estos subtipos.

Hasta la fecha no se ha conseguido clonar el subtipo α_1A , pero una de sus características más dignas de ser subrayadas es que muestra una farmacología de alta afinidad por los antagonistas 5metil urapidil, benoxatian y niguldipina también presenta alta afinidad por el agonista metoxamina.

El receptor α_1B , por su lado, es una proteína de 515 aminoácidos que se halla glicosilada en los residuos 10,23,28 y 33. Presenta así mismo serinas y treoninas en la segunda y tercera asas citoplásmicas. Se encuentra localizado en el cromosoma 5 y su farmacología ha mostrado alta afinidad por los antagonistas prazosina, espiperona y sensibilidad a cloroetclonidina. Los agonistas, en cambio metoxamina y oximetazolina no muestran afinidad por este sistema. En otra serie de determinaciones se encontró que un fragmento de 27 aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 233-259 estaban implicados en establecer la selectividad a la proteína G (84a). Otros autores observaron que la sustitución de la alanina 293 puede conferir al receptor activación constitutiva (85a)..

El último subtipo de receptor que fue clonado y secuenciado por el grupo de Lefkowitz es el α_1C , que presenta 466 aminoácidos y sitios de glicosilación en asparaginas 7, 13 y 22. Dispone también de residuos de serina y de treonina en la segunda y tercera asa intracelular y se encuentra ubicado en el cromosoma 8 del genoma humano. La farmacología ha mostrado que la metoxamina y oximetazolina pueden funcionar como buenos agonistas en el

subtipo que se viene examinando y que los antagonistas WB-4101 y 5-metilurapidil presentan también un grado importante de afinidad por el mismo subtipo. Es importante señalar que los subtipos α_1B y α_1C contienen cuando menos un intrón, lo que podría servir para caracterizar de una manera más terminante la naturaleza de esta molécula una vez que se haya dilucidado en forma detallada la función evolutiva de los intrones (Tabla II).

En 1990, por último, Pérez y colaboradores (85), trabajando en la universidad de Ohio, reportaron la presencia de un subtipo α_1 adicional que denominaron α_1D . El receptor en cuestión, que es el benjamín de la familia hasta el día de hoy, está constituido por 560 aminoácidos y se encuentra localizado en el cromosoma 20. El subtipo, además, presenta dos sitios de glicosilación y varias serinas y treoninas ubicadas en el carboxilo terminal y en las asas intracelulares. Hasta el día de hoy no ha podido establecerse con certeza la relación de este receptor con el subtipo α_1A .

Este mismo grupo de investigadores (86) en fecha posterior observó que la expresión de los subtipos B y D en células COS-1 pueden incrementar la hidrólisis de fosfatos de inositol a través de una proteína G insensible al tratamiento con toxina *pertussis*, estos mismos subtipos pueden incrementar el AMPc y finalmente observaron la activación de fosfolipasa A_2 mediante un mecanismo que es sensible a la toxina *pertussis*.

A partir del momento en que la hormona interacciona con el receptor, éste transmitirá la señal al entorno celular a través de una proteína fijadora de nucleótidos de guanina, que es la encargada de activar a la fosfolipasa C, que es en última instancia el miembro efector del sistema α_1 adrenérgico. Inicialmente existían una serie de evidencias importantes que parecían indicar la participación de una proteína G en la actividad de la fosfolipasa C pero los resultados eran poco claros.

TABLA II CARACTERISTICAS FARMACOLOGICAS DE LOS RECEPTORES α_1 ADRENERGICOS

SUBTIPO	α_1A	α_1B	α_1C
AFINIDAD PARA AGONISTAS	ADRE>NORADRE>METOX	ADREN=NORADRE>>METOX	NORADR>ADRE>>METOX
ANTAGONISTAS	WB4101>PRAZ=5MU	PRAZ>>WB4101>5MU	PRAZ>WB4101>>5MU
SENSIBILIDAD CLOROETILCLONIDINA	INSENSIBLE	SENSIBLE	SENSIBLE

ADRE: ADRENALINA
 NORADR: NORADRENALINA
 METOX: METOXAMINA
 PRAZ: PRAZOSINA
 5MU: 5-METILURAPIDIL

Se publicaron resultados en los que se mostraba la participación de una proteína G en la activación de una fosfolipasa C citosólica en diferentes tipos celulares entre los que se encontraban plaquetas, timocitos de cerebro y los promielocitos humanos H60 (87-90). Posteriormente Balsdassare y un grupo de colaboradores identificaron a la proteína fijadora de nucleótidos de guanina como un miembro de proteínas con bajo peso molecular de 29 kDa (89).

En otra serie de determinaciones se encontró que la activación de la fosfolipasa C requería GTP, resultados que se observaron en glándulas salivales, músculo liso, fibroblastos, cerebro y células de riñón. Datos muy parecidos se habían obtenido también en membranas de hepatocitos de rata, leucocitos humanos y eritrocitos de pavo (91-100). Otros autores habían afirmado que esta proteína G era sensible al tratamiento con la toxina *pertussis*, lo que provocaba un bloqueo en el recambio de fosfolinosítidos en algunos tipos celulares. Durante muchos años la participación de una proteína G permaneció en un estado de incertidumbre, pero lo que es interesante subrayar es que dependiendo de las condiciones del ensayo, como adición de detergentes, presentación de sustrato y tipo de amortiguador utilizado se podían observar o no efectos de una proteína fijadora de nucleótidos sobre la actividad de la fosfolipasa C (101). Algunos años después el grupo de John Exton (100), usando como modelo de estudio hígado de bovino y en las mismas condiciones de ensayo mencionadas en líneas anteriores, lograron desarrollar un procedimiento experimental que permitía aislar a la proteína G capaz de activar a la fosfolipasa C. El ensayo consistía en la extracción de la enzima con colato y el paso crítico radicaba en poder activar a la proteína G después de la extracción. Estos experimentos llegaron a feliz término cuando se logró caracterizar a esta proteína G como un miembro de las proteínas Gq y se observó también que la subunidad α_q , con un peso molecular de 42 kDa era la responsable de activar a la fosfolipasa C. La familia de las proteínas Gq fueron

purificadas por Sternweiss (102) y reconstituídas en presencia de la fosfolipasa C subtipo β_1 . Las subunidades alfa y beta-gama participan asimismo en la activación de la fosfolipasa c, hallazgo de gran significación que vino a demostrar que la citada fosfolipasa puede ser activada de modo simultáneo o paralelo por una segunda molécula que hasta ese día había permanecido en la penumbra. La familia de las proteínas Gq comprende al menos cinco miembros a los que se han denominado Gq, G11, G14, G15 y G16 (103). Este investigador confirmó además que el sistema no era sensible al tratamiento con toxina *pertussis*. Se han realizado un gran número de estudios para saber si la proteína G, encargada de activar a la fosfolipasa C, es sensible al tratamiento con esta toxina. Los datos obtenidos en relación a la sensibilidad de este sistema de transducción al tratamiento con la toxina permanecen sumidos en una atmósfera de controversia y desacuerdo. Se ha observado que en determinados tipos celulares presentan sensibilidad al tratamiento con la toxina. Podríamos mencionar como ejemplo adipocitos estimulados con adrenalina, hígado estimulado por factor de crecimiento epidermal, músculo liso estimulado por adrenalina, angiotensina y serotonina (108-111). En otros tipos celulares se observó sensibilidad parcial en el tratamiento con la toxina, tal es el caso de células gástricas, fibroblastos y neutrófilos. Otros investigadores no han encontrado efectos en el tratamiento con la toxina *pertussis* sobre la activación de la fosfolipasa C, como en adipocitos, fibroblastos, plaquetas, hígado y mastocitos, (111 - 115) por mencionar sólo unos casos.

El cuadro general del sistema α adrenérgico se completa de modo espectacular con la fosfolipasa C, que tiene como función primordial hidrolizar al fosfatidil inositol 4,5 bifosfato en inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). Las moléculas citadas funcionan como segundos mensajeros en este sistema. Diversos estudios han mostrado que la fosfolipasa C es una enzima que reside

de modo predominante en el citosol y también se han detectado algunas actividades asociadas a la membrana .

Hasta el día de hoy se han caracterizado tres miembros de esta distinguida familia: β , γ y δ . En fechas recientes se ha propuesto la existencia de otros dos miembros complementarios: α y epsilon. Se sabe que la familia de la fosfolipasa C β (β_1 , β_2 y β_3) es regulada por proteínas G, mientras que los miembros de la familia gama están regulados por tirosina cinasas. La β_1 , que ha sido caracterizada en cerebro de bovino y rata, puede ser activada por la proteína Gq y presenta un peso molecular de 57 a 70 kDa. Se ha sabido también que la fosfolipasa C β_1 es fosforilada en residuos de serina por la proteína cinasa C y que la actividad catalítica de esta enzima no se ve afectada por la fosforilación en ensayos *in vitro*. Se ha observado que las fosfolipasas β , δ y γ presentan dos regiones de alta similitud a las que por convención se ha designado X y Y. Estas regiones están constituidas por 150 y 240 aminoácidos, respectivamente, y la similitud que comparten estos dominios es del cuarenta por ciento (116).

Una vez que la fosfolipasa C ha sido activada se produce inositol trifosfato, que tiene la facultad de movilizar el calcio intracelular del retículo endoplásmico mediante la participación de un receptor específico que ha recibido el nombre de calciosoma (117). Es pertinente mencionar que Leijten y colaboradores (118) han propuesto otro mecanismo en el que observaron que existen depósitos de calcio en la membrana plasmática que posiblemente sirvan para liberar el calcio del retículo endoplasmático.

Los incrementos de calcio obtenidos por la vía señalada son capaces de activar procesos tan importantes como la glucogenólisis y la contracción muscular. El aumento en los niveles de calcio puede ser regulado por las mitocondrias, organelos que se encargan de capturarlo mediante la activación

de un acarreador localizado en la parte exterior de la membrana interna mitocondrial (119).

Se ha visto así mismo que el incremento en el calcio citosólico puede responder a diferentes mecanismos de regulación. Algunos investigadores han observado que al incubar células hepáticas en ausencia de calcio extracelular la respuesta α_1 -adrenérgica persiste pero no las respuestas a vasopresina y angiotensina, que también se encuentran acopladas al mismo sistema de transducción (120). Se observó, por otro lado, que en ratas adrenalectomizadas la respuesta α_1 - adrenérgica es dependiente del calcio extracelular (121). Con los datos obtenidos por Dr. García-Sáinz y Hernández-Sotomayor (120) se llegó a la conclusión de que existían dos mecanismos para los efectos metabólicos en la activación α_1 -adrenérgica en hígado. El primero de ellos, que es independiente del calcio extracelular, puede ser inhibido por insulina y modulado por glucocorticoides. El segundo es insensible a insulina y modulado por la hormona tiroidea. Estos datos sugerían que los diferentes subtipos de receptores α_1 podrían estar sujetos a diferentes mecanismos de regulación. En 1987 el grupo de Minneman (76) propuso que los receptores α_1 -adrenérgicos en músculo liso estaban implicados en promover la entrada de calcio por medio de canales de calcio sensibles a dihidropiridinas mientras que los receptores $\alpha_1\beta$ iniciaban su señal por el mecanismo que hemos descrito en líneas anteriores. En fechas más recientes, por último, encontramos que en hepatocitos de cuyo, que expresan el subtipo α_{1A} , tanto el recambio de fosfoinosítidos como la activación de la fosforilasa a , no se afectaban en ausencia de calcio extracelular (122).

Putney y DeWitt (123) sugirieron la posibilidad de que los depósitos de calcio intracelulares no fueran suficientes para atender las demandas de calcio

en respuesta a la estimulación α_1 adrenérgica; o bien que la activación de la respuesta α_1 -adrenérgica cambie según el tipo celular.

El inositol trifosfato puede ser metabolizado rápidamente por dos vías alternas. La primera de ellas lo convierte en inositol 1,3,4,5 tetrafosfato, mediante la fosforilación provocada por una cinasa. La segunda vía se produce por la degradación de este metabolito a través de varias fosfatasa que lo convierten en inositol-1 bifosfato, inositol-1 fosfato y mioinositol, que lo dejará en condiciones de volver a integrarse a una nueva ruta metabólica (124).

El diacilglicerol, que es el otro mensajero producido por la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato, es un compuesto de vida transitoria. La veloz degradación de este compuesto lo convierte en ácido fosfatídico o en 1-acilglicerol y ácido araquidónico, que podrá participar en la formación de prostaglandinas.

El diacilglicerol desempeña la importante función de activar a la proteína cinasa C, lo que se produce de manera instantánea pero ejerciendo efectos de larga duración. La activación de la proteína cinasa C, que es el último efector producido en la respuesta α_1 adrenérgica, fosforila residuos de serina y treonina. Yatsutomi Nishizuka demostró en 1977 que se trata de una proteína con propiedades de translocarse a la membrana mediante un sistema dependiente de calcio. Estudios recientes han demostrado que la proteína cinasa C requiere de calcio y fosfolípidos, en particular de la fosfatidilserina, que interviene de manera decisiva en la translocación de la enzima (125).

Hasta el momento se han caracterizado diez formas de esta enzima denominadas α , β I, β II, γ , δ , ϵ , τ , η , ω , ξ . Cada una de estas Isoenzimas están constituidas por un solo polipéptido con un peso molecular de 80 kDa. La actividad de cinasa se halla localizada en una región próxima al carboxilo terminal y que tiene un peso molecular de 45 kDa, que se ha denominado

dominio catalítico, mientras la región del amino terminal tiene un peso molecular de 35 kDa esta última corresponde a la región o dominio regulatorio que es además hidrofóbico. Estos dominios pueden ser separados por proteólisis limitada en una región que comprende residuos de aminoácidos que difieren entre las isoenzimas. La proteína cinasa C posee cuatro regiones conservadas y separadas por cinco regiones variables pequeñas (125).

Se ha demostrado que el dominio regulatorio se asocia a cuatro átomos de zinc en una región en donde se encuentran residuos de cisteína muy conservados y que son los responsables de efectuar la interacción referida. La porción regulatoria tiene como función preponderante efectuar la unión de calcio, diacilglicerol y fosfolípido y además puede regular la función catalítica de la enzima.

El dominio catalítico presenta dos regiones conservadas la región conservada tres (C3) cuya función principal es la de presentar la secuencia de aminoácidos que permitan la asociación de trifosfato de adenosina (ATP) y una región conservada de mayor longitud denominada C4 que presenta determinantes responsables de la asociación de la enzima con el sustrato (125, 126).

Se han desarrollado fármacos que poseen la facultad de activar a la enzima en ausencia de estímulo hormonal. Uno de ellos es el 12-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), cuya estructura presenta una similitud al diacilglicerol. La acción del fármaco se produce al incrementar la afinidad de la enzima por los iones de calcio, lo que permite activarla sin necesidad de promover, además, un incremento de las concentraciones de calcio. Durante los últimos años se ha podido demostrar que la activación de la proteína cinasa C por el TPA puede inducir una variedad de respuestas celulares. Como ejemplo se encuentran la expresión de ciertos genes, como el de la ornitina descarboxilasa, la histidina

descarboxilasa, la serotonina acetil transferasa, la calcitonina, la prolactina y la expresión de oncogenes como c-fos y c-myc, lo cual es de suma importancia porque sus acciones se hallan asociadas a la expresión de factores de crecimiento y proliferación celular (125).

Es pertinente subrayar que la proteína cinasa C no sólo participa en la fosforilación de sustratos citosólicos sino que puede hacer lo mismo con sustratos situados en la membrana plasmática, como el receptor α_1 adrenérgico, en donde se observó que el tratamiento con TPA en hepatocitos de rata provoca cambios en el estado de afinidad de estos receptores (127). Es importante hacer notar que el efecto descrito es exclusivo para el receptor α_1 adrenérgico, ya que otros receptores, como los que responden a vasopresina y angiotensina, y que se hallan acoplados al mismo sistema de transducción, no presentan modificaciones cuando se produce la activación de la proteína cinasa C.

Es interesante subrayar que las acciones de la proteína cinasa C sobre el receptor α_1 se deben a un aumento de la fosforilación en residuos de serina y treonina que, por cierto, ya se hallaban fosforilados en menor medida antes de que se produjera la activación de la enzima.

Se ha visto además que la respuesta α_1 -adrenérgica no sólo interviene en la activación de la fosfolipasa C sino que puede también estimular a la fosfolipasa A_2 y D. Podrían mencionarse, como casos ilustrativos al respecto, las células derivadas de tiroides, en las que la respuesta α_1 -adrenérgica estimula a la fosfolipasa A_2 a través de un mecanismo sensible a toxina Pertussis y a la fosfolipasa C a través de un mecanismo insensible a la toxina (129). Esta diversidad para la hidrólisis del sustrato origina la posibilidad de incrementar la gama de segundos mensajeros conocidos que pudieran intervenir en la regulación del sistema.

ANTECEDENTES

El estudio de los receptores α adrenérgicos, que se inició en 1948, ha recibido una atención constante desde aquella época y durante los últimos años ha ingresado en una fase incontenible de expansión. Como se ha dicho en líneas anteriores se han clonado diez diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, los que han sido localizados, posteriormente, en los tejidos y los órganos donde ejercen sus efectos primordiales. Los receptores α_{1A} , por ejemplo, han sido caracterizados en cerebro, los α_{1B} en hígado, los α_{1C} en células olfatorias y los α_{1D} en "vas deferens". La diversidad topográfica de estos subtipos sugirió a los investigadores que todos ellos se estaban expresando de una manera muy selectiva según el tejido en el que se hallaban emplazados. Pero no fue sino en 1992 cuando se observó que en un mismo tejido hepático, pero de diferentes especies, había heterogeneidad en la expresión de los subtipos de receptores α_1 . Mediante estudios de farmacología, biología molecular y comportamiento de los segundos mensajeros, García Sainz (129) logró determinar que en células hepáticas de diferentes especies se expresaban distintos subtipos de receptores α_1 adrenérgicos. De esta manera encontró que en hepatocitos de cuyo se expresaba el subtipo α_{1A} ; en rata el α_{1B} y en conejo el α_{1C} . Continuando con esta misma línea de indagaciones se decidió caracterizar el receptor α_1 adrenérgico en pollo debido a que es otro representante de los vertebrados en los que abundan estos receptores, según demostró Susana Sulakhe en 1988 (130).

OBJETIVOS

Los móviles de este trabajo se inspiraron en los estudios existentes sobre la caracterización de los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos en hepatocitos de otras especies que fueron realizados en el laboratorio del doctor García Saínz. A partir de estas indagaciones nos propusimos la caracterización farmacológica del subtipo de receptor α_1 -adrenérgico presente en los hepatocitos de pollo. Se decidió, así mismo, estudiar los segundos mensajeros y el sistema de transducción al cual se hayan acoplados.

MÉTODOS Y MATERIALES

La metodología utilizada en la realización de este proyecto se halla descrita en el artículo que se preparó como parte fundamental en esta tesis y que se encuentra a continuación.

Determinación de AMPc: se incubaron 20 mg. de hepatocitos durante 2 min. a 37°C en presencia de las hormonas y 100 μ M de metilisobutilxantina para inhibir la acción de las fosfodiesterasas. La determinación se realizó de acuerdo a Brown et. al. (131).

RESULTADOS

Los resultados que se exponen a continuación se publicaron en el trabajo:

Gloria Gutiérrez-Venegas and J. Adolfo García-Sáinz.

Characterization of the alfa 1β -Adrenergic receptors of chicken hepatocytes. Signal transduction and actions. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 106C, No. 3 pp. 797-803, (1993).

CHARACTERIZATION OF THE α_{1B} -ADRENERGIC RECEPTORS OF CHICKEN HEPATOCYTES. SIGNAL TRANSDUCTION AND ACTIONS

GLORIA GUTIÉRREZ-VENEGAS and J. ADOLFO GARCÍA-SÁINZ

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248; 04510 México D.F. (Fax 011 525 622-56-11)

(Received 4 June 1993; accepted for publication 14 June 1993)

Abstract—1. In chicken hepatocytes, α_1 -adrenoceptor activation increased: (a) phosphatidylinositol labeling; (b) production of inositol trisphosphate; (c) cytosol calcium; and (d) phosphorylase activity.

2. Prazosin ($K_D \approx 0.2$ – 0.4 nM) was more potent in inhibiting these actions than 5-methyl-urapidil ($K_D \approx 30$ – 60 nM); these actions were sensitive to chlorethylclonidine suggesting the involvement of α_{1B} -adrenoceptors.

3. The stimulation of phosphoinositide turnover was insensitive to pertussis toxin.

4. In chicken liver membranes, [125 I]prazosin binding sites ($P_{50} \approx 572$ fmol/mg protein) with high affinity for prazosin (K_D 0.3 nM; K 0.4 nM) and lower affinity for 5-methyl-urapidil (K_D 46 nM) were detected, consistent with the presence of α_{1B} -adrenoceptors.

INTRODUCTION

α_1 -Adrenoceptors constitute a heterogeneous family of receptors. The existence of two subtypes, the α_{1A} - and the α_{1B} -adrenoceptors, was initially suggested by pharmacological criteria (Morrow and Creese, 1986; Minneman, 1988). The α_{1B} receptor has now been cloned and expressed (Cotecchia *et al.*, 1988), but the cloning of the α_{1A} -adrenoceptor has not yet been achieved. Nevertheless, when attempting to clone it, two other subtypes, the α_{1C} - and the α_{1D} -adrenoceptor receptors were identified, cloned and expressed (Schwinn *et al.*, 1990; Perez *et al.*, 1991; Schwinn and Lomasney, 1992). Thus, at this point, at least four subtypes of α_1 -adrenoceptor family seems to exist (Perez *et al.*, 1991; Schwinn and Lomasney, 1992; García-Sáinz, 1993). The pharmacological definition of each subtype is far from easy. Among the agents that seem to be particularly useful for the classification are the antagonists chlorethylclonidine (Minneman, 1988) and WB4101 (Morrow and Creese, 1986). The former agent, is an alkylating antagonist that seems to be able to block all of these receptors except the α_{1A} -subtype (Minneman, 1988). WB4101 is a competitive antagonist with relatively low affinity for the α_{1A} -adrenoceptor as compared to the other subtypes (Morrow and Creese, 1986; Schwinn and Lomasney, 1992). Regarding agonist activity, methoxamine and oxymetazoline have very little activity on α_{1B} -adrenoceptors whereas they are active on cells expressing α_{1A} or α_{1C} -adrenoceptors (García-Sáinz *et al.*, 1985; García-Sáinz *et al.*, 1993).

We have recently observed that there is considerable variation in the α_1 -adrenoceptor expressed in liver cells of different species. Thus, guinea pig

hepatocytes express α_{1A} - (García-Sáinz *et al.*, 1992a; García-Sáinz *et al.*, 1992b), rat hepatocytes α_{1B} - (García-Sáinz *et al.*, 1992a; Torres-Márquez *et al.*, 1991) and rabbit hepatocytes α_{1C} -adrenoceptors (García-Sáinz *et al.*, 1991; Schwinn *et al.*, 1991). It has been previously observed that the livers from aves (budgerigars, *M. undulatus* and chickens, *G. domesticus*) have a very high density of α_1 -adrenoceptors (Sulakhe *et al.*, 1988); however, to the best of our knowledge, neither the α_1 -adrenoceptor subtype(s) present in the liver cell membranes of these species nor the signal transduction process to which they are coupled has been characterized. Here, we present the characterization of the α_1 -adrenoceptors expressed in chicken liver cells using both functional (metabolic and signal transduction studies) and radioligand binding approaches.

MATERIALS AND METHODS

1-Adrenaline, 1-noradrenaline, phenylephrine, DL-propranolol, glucose-1-phosphate, glycogen, digitonin, caffeine, β -glycerophosphate, prazosin, and Quin 2/AM were from Sigma Chemical Co. Methoxamine was a generous gift from Burroughs Wellcome. 5-Methyl-urapidil and WB4101 were from Research Biochemicals Inc. [32 P]Pi (carrier free), [adenylate- 32 P]NAD (800 Ci/mmol), α -D- 14 C (U)]glucose-1-phosphate (233.9 mCi/mmol) and [methoxy- 3 H]prazosin (60 Ci/mmol) were from New England Nuclear. The D-myo-[3 H]inositol 1,4,5-trisphosphate assay system was obtained from Amersham. Pertussis toxin was purified (Sekura *et al.*, 1983) from pertussis vaccine concentrates, generously

provided by the National Institute of Hygiene (Mexico).

Hepatocytes were obtained from chickens (4–5 weeks old) by liver perfusion with collagenase (Berry and Friend, 1969). Hepatocytes were incubated in Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4 at 37°C under an atmosphere of 95% O₂/5% CO₂. Cell viability was routinely higher than 95% as evidenced by trypan blue exclusion.

Phosphatidylinositol (PI) labeling was carried out as described (García-Sáinz, 1987); in brief, cells were incubated for 60 min in buffer containing 10 μ Ci of [³H]PI, lipids were extracted with chloroform/methanol (2:1) and phospholipids separated by thin layer chromatography. Radioactivity incorporated into phosphatidylinositol was counted in silica gel scrapings. To quantify the production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), cells were pre-incubated for 10 min in buffer containing 10 mM LiCl, agonists were added and after 5 min the reaction was stopped. IP₃ was quantified following the assay kit directions. Phosphorylase *a* activity was assayed as described by Stalmans and Hers (1975).

Intracellular calcium was quantified using Quin 2, as described (García-Sáinz *et al.*, 1990). In brief, cells were incubated for 20 min in the presence of Quin 2/AM. After this, the cells were washed and incubated in Krebs-Ringer buffer supplemented with 20 mM Hepes and 10 mM glucose, pH 7.4, and maintained in an ice bath. Cells were pre-warmed at 37°C for 5 min. Fluorescence (excitation 333 nm, emission 510 nm) was recorded in an Aminco-Bowman spectrofluorimeter equipped with a thermostatically controlled chamber and stirring.

In the experiments where the effect of pertussis toxin was analyzed, chickens were treated with 100 μ g pertussis toxin 3 days before the experiment was performed. In order to determine if the effect of the toxin was complete with this treatment, liver membranes were obtained (Neville, 1968) and subjected to pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation as described (García-Sáinz *et al.*, 1989).

Binding studies were performed by incubating membranes (100 μ g protein) with [³H]prazosin, alone or with the indicated agents, in a total volume of 0.5 ml for 30 min, in a water bath shaker at 25°C. At the end of the incubation, 10 ml of ice-cold buffer were added to the membrane suspension, which was immediately filtered on GF/C filters (Whatman) and washed three times (10 ml each time) with the same buffer. Saturation experiments were performed using 0.025–6 nM [³H]prazosin and binding competition studies with 1.5–2 nM of the radioactive ligand (80–85% receptor occupation). Non-specific binding was evaluated in the presence of 10 μ M phentolamine; specific binding represented 75–80% of the total binding at the K_D. Binding saturation and competition data were analyzed using the EBDA program (Biosoft-Elsevier). K_is were calculated according to Cheng and Prusoff (1973). Protein was

quantified by the method of Lowry *et al.* (1951) using bovine serum albumin as standard.

RESULTS

The labeling of phosphatidylinositol was dose-dependently stimulated by noradrenaline, adrenaline and phenylephrine (in the presence of 10 μ M propranolol to block their β -adrenergic activity). The stimulation induced by the natural catecholamines was of large magnitude (\approx 10-fold) and observed at relatively low concentrations (EC₅₀ \approx 300 nM). Phenylephrine was less potent than the natural catecholamines and even at the highest concentration tested, no saturation was observed (Fig. 1). Methoxamine was without any effect at the concentrations tested (Fig. 1).

The effect of irreversible α_1 -adrenergic antagonists was tested. Preincubation of the cells with 100 μ M chloroethylclonidine for 15 min markedly reduced the effect of noradrenaline (plus 10 μ M propranolol) as compared to that of cells preincubated without any agent (Fig. 2). Furthermore, in cells pre-treated with this alkylating antagonist, the dose-response to noradrenaline plus 10 μ M propranolol, became rather flat and did not reach saturation at the concentrations tested. Preincubation with 1 μ M prazosin completely abolished the effect of noradrenaline plus propranolol (Fig. 2).

In another series of experiments we tested the ability of prazosin and 5-methyl-urapidil to block the effect of 10 μ M noradrenaline (plus 10 μ M pro-

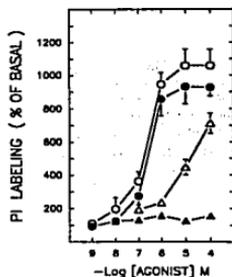


Fig. 1. Effect of adrenergic agonist on phosphatidylinositol (PI) labeling. Chicken hepatocytes were incubated with 10 μ M propranolol in the absence or presence of the indicated concentration of adrenaline (open circles), noradrenaline (solid circles), phenylephrine (open triangles) or methoxamine (solid triangles). Basal labeling of phosphatidylinositol was 123 \pm 21 cpm/mg cells wet weight. Plotted are the means and vertical lines represent the SEM of eight different experiments, each one performed in triplicate; where no error bars are presented they are within the symbol.

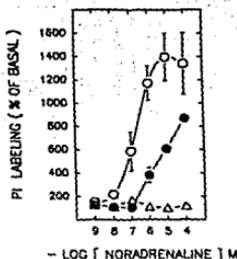


Fig. 2. Effect of preincubation with chloroethylclonidine or prazosin on noradrenaline-stimulated phosphatidylinositol (PI) labeling. Chicken hepatocytes were preincubated for 15 min in the absence (open circles) or presence of 100 μ M chloroethylclonidine (solid circles) or prazosin (open triangles); after this preincubation, the cells were washed and the PI labeling study was carried out. Other indications as in Fig. 1.

pranolol). It can be observed in Fig. 3, that both prazosin and 5-methyl-urapidil were able to block the effect in dose-dependent fashions; however, prazosin ($IC_{50} \approx 10$ nM; $K_i \approx 0.29$ nM) was 200-fold more potent than 5-methyl-urapidil ($IC_{50} \approx 2$ μ M, $K_i \approx 58$ nM).

Labeling of phosphatidylinositol is admittedly secondary to the initial hydrolysis by phospholipase C of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to generate two second messengers IP_2 and diacylglycerol (Berridge and Irvine, 1984). Therefore, we decided

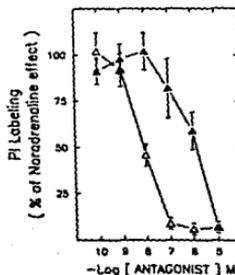


Fig. 3. Effect of prazosin or 5-methyl-urapidil on noradrenaline-stimulated phosphatidylinositol (PI) labeling. Chicken hepatocytes were incubated with 10 μ M propranolol plus 10 μ M noradrenaline in the absence or presence of the indicated concentrations of prazosin (open triangles) or 5-methyl-urapidil (solid triangles). In these experiments, 10 μ M noradrenaline increased PI labeling 1060 \pm 120% of basal. Other indications as in Fig. 1.

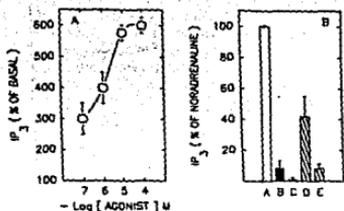


Fig. 4. Effect of α_1 -adrenergic agents on the production of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). Chicken hepatocytes were incubated as described under Materials and Methods in the presence of 10 μ M propranolol and with either (panel A) the indicated concentrations of noradrenaline (open circles) or (panel B) with 10 μ M noradrenaline alone (A) or with prazosin (1 μ M, B; 10 μ M, C) or 5-methyl-urapidil (1 μ M, D; 10 μ M, E). Basal IP_3 was 65 \pm 5 pmol/50 mg cells wet weight. Plotted are the means and vertical lines represent the SEM of 3-5 different experiments each one performed in triplicate.

to directly quantitate the effect of α_1 -adrenergic agents on the production of IP_3 . It can be observed in Fig. 4, that noradrenaline (plus propranolol) dose-dependently induced the production of this second messenger and that such an effect was blocked by prazosin and 5-methyl-urapidil, the former being more potent than the later.

It is well known that IP_3 induces mobilization of calcium from intracellular stores, increasing the concentration of this cation in the cytoplasm (Berridge and Irvine, 1984). Therefore, we next determine if the α_1 -adrenergic action was associated with increases in cytosol calcium. Basal calcium concentration was estimated to be \approx 115 nM; addition of 10 μ M norepinephrine (plus 10 μ M propranolol) immediately increased cytosol calcium to \approx 485 nM (see representative tracings in Fig. 5). Such an effect was blocked by 5-methyl-urapidil (prazosin could not be used due to its intrinsic fluorescence); the effect of 5-methyl-urapidil was receptor-specific since the cells were still able to increase their cytosol calcium in response to the unrelated agent, ATP (Fig. 5C).

Increases in cytosol calcium lead, in many cells, to activation of phosphorylase and glycogenolysis (Cohen, 1982). The effect of adrenergic agents on phosphorylase α activity was next assayed. Norepinephrine (plus 10 μ M propranolol) increased, dose-dependently ($EC_{50} \approx 100$ nM), almost 2-fold the activity of phosphorylase α (Fig. 6). Prazosin ($IC_{50} \approx 30$ nM; $K_i \approx 0.29$ nM) and 5-methyl-urapidil ($IC_{50} \approx 3$ μ M, $K_i \approx 30$ nM) inhibited the α_1 -adrenergic action (Fig. 6).

Binding studies using [3H]prazosin were next performed. Scatchard analysis of saturation isotherms resulted in straight lines indicating that the ligand

extrapolated without verification from one species to another. We consider the characterization of the hepatic receptors expressed in different species to be of interest since it may give insights on the physiological and evolutive significance of such variation. It is of interest to mention that, for the β -adrenoceptors, it has been observed that the β_2 -adrenoceptor is much less subjected to phosphorylation and desensitization than the β_1 receptor, and it is very possible that such a difference may have physiological implications (Liggett *et al.*, 1993). Activation of protein kinase C with phorbol esters blocks and desensitizes the α_{1B} -adrenoceptor of rat hepatocytes (Corvera and García-Sáinz, 1984; Corvera *et al.*, 1986); interestingly, the α_{1A} -adrenoceptors of guinea pig hepatocytes seem to be much less sensitive to phorbol esters (García-Sáinz *et al.*, 1992b). However, the molecular basis of such difference in sensitivity and its physiological significance are presently unknown. Certainly much more work will be required to clarify these aspects.

Acknowledgments—The authors want to express their gratitude to Mr Manuel Echeverría for generously donating all the chickens used in the present study. They also thank Drs Rafael Villalobos-Molina and Marina Macías-Silva for help and advice with the IP₃ determinations and intracellular calcium measurements, and Gerardo Coello, Ana María Escalante and Fernando López for help with the computer programs. The secretarial help of Mrs Guadalupe Ramírez is gratefully appreciated. This research was partially supported by grants from DGAPA (IN200193) and CONACyT (0310-N9107).

REFERENCES

- Berridge M. J. and Irvine R. F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315–321.
- Berry M. N. and Friend D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506–520.
- Cheng Y.-C. and Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of an inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108.
- Cohen P. (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* **296**, 613–620.
- Corvera S. and García-Sáinz J. A. (1984) Phorbol esters inhibit alpha-adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**, 1128–1133.
- Corvera S., Schwarz K. R., Graham R. M. and García-Sáinz J. A. (1986) Phorbol esters inhibit alpha-adrenergic effects and decrease the affinity of liver alpha-adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* **261**, 520–526.
- Cotecchia A., Schwinn D. A., Randall R. R., Lefkowitz R. J., Caron M. G. and Kobilka B. K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7159–7163.
- García-Sáinz J. A. (1987) Pathways of the α_1 -adrenergic action. Comparison with V₁-vasopressin and A₁-angiotensin. *Circ. Res.* **61** (suppl 1): 1–5.
- García-Sáinz J. A. (1993) α_1 -Adrenergic action, receptor subtypes, signal transduction and regulation (Minireview). *Cell. Signalling* (in press).
- García-Sáinz J. A., Huerta-Bahena M. E. and Malbon C. C. (1989) Hepatocyte β -adrenergic responsiveness and guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Am. J. Physiol.* **256**, C384–C389.
- García-Sáinz J. A., Macías-Silva M., Hernandez-Sotomayor S. M. T., Torres-Marquez M. E., Trivedi D. and Hraby V. J. (1990) Modulation of glucagon actions by phorbol myristate acetate in isolated hepatocytes. Effects of hypothyroidism. *Cell. Signalling* **2**, 235–243.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Alcantara-Hernandez R. and Macías-Silva M., Olivares-Reyes A. and Gonzalez-Espinosa C. (1992) Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptors: α_{1A} , α_{1B} and α_{1C} subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 760–767.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Alcantara-Hernandez R. and Olivares-Reyes A. (1993) Different sensitivity to methoxamine and oxymetazoline of hepatocytes expressing α_{1A} , α_{1B} or α_{1C} -adrenoceptors. *Pharmac. Commun.* **2**, 339–344.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Olivares-Reyes J. A. and Macías-Silva M. (1992) Guinea pig hepatocyte α_1 -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 239–245.
- García-Sáinz J. A., Villalobos-Molina R., Corvera S., Huerta-Bahena J., Tajimoto G. and Hoffman B. B. (1985) Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the alpha-adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **112**, 393–397.
- Han C., Wilson K. M. and Minneman K. P. (1990) α_1 -Adrenergic receptor subtypes and formation of inositol phosphates in dispersed hepatocytes and renal cells. *Molec. Pharmacol.* **37**, 903–910.
- Helman J., Kusiak J. W., Pitha J. and Baum B. J. (1987) Inhibition of α_1 -adrenergic responsiveness in intact cells by a new irreversible receptor antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 403–409.
- Liggett S. B., Freedman N. J., Schwinn D. A. and Lefkowitz R. J. (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β_1/β_2 -adrenergic receptor. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3665–3669.
- Lowy O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Mante S. and Minneman K. P. (1991) The alkylating prazosin analog SZL 49 inactivates both α_{1A} and α_{1B} adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **208**, 113–117.
- Michell R. H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 81–147.
- Minneman K. P. (1988) α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmac. Res.* **40**, 87–119.
- Mutrow L. A. and Creese I. (1986) Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [³H]WB4101 and [³H]prazosin binding. *Molec. Pharmacol.* **29**, 321–330.
- Neville D. M., Jr (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **154**, 540–552.
- Perez D. M., Piascik M. T. and Graham R. M. (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an α_{1C} -adrenergic receptor cDNA. *Molec. Pharmacol.* **40**, 876–883.
- Piascik M. T., Butler B. T., Pruitt T. A. and Kusiak J. W. (1990) Agonist interaction with akltylation-sensitive and -resistant alpha-adrenoceptor subtypes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **254**, 982–991.
- Schwinn D. A. and Lomasney J. W. (1992) Pharmacological characterization of cloned α_1 -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype. *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 433–436.

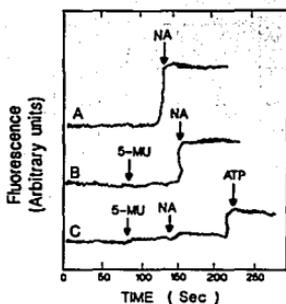


Fig. 5. Effect of adrenergic agents and ATP on intracellular Ca^{2+} . Cells were incubated in the presence of $10 \mu\text{M}$ propranolol; where indicated $10 \mu\text{M}$ noradrenaline (NA), 5-methyl-urapidil (5-MU; B, $1 \mu\text{M}$; C, $10 \mu\text{M}$) or $1 \mu\text{M}$ ATP were added. Representative tracings are shown.

interacts with a single class of binding sites in chicken liver membranes (a representative experiment is presented in Fig. 7); a K_D of $0.30 \pm 0.17 \text{ nM}$ and a B_{max} of $870 \pm 102 \text{ fmol/mg}$ protein were observed (data are the mean \pm SEM of four experiments using different membrane preparations). Binding competition experiments indicated the following order of potency: prazosin (K_D $0.40 \pm 0.15 \text{ nM}$) $>$ WB4101 ($30 \pm 15 \text{ nM}$) $>$ 5-methyl-urapidil ($45 \pm$

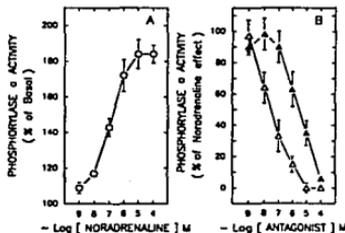


Fig. 6. Effect of noradrenaline and α_1 -adrenergic antagonist on phosphorylase α activity. Chicken hepatocytes were incubated with $10 \mu\text{M}$ propranolol and either (panel A) the indicated concentrations of noradrenaline (open circles) or (panel B) $10 \mu\text{M}$ noradrenaline and the indicated concentrations of prazosin (open triangles) or 5-methyl-urapidil (solid triangles). Basal phosphorylase α activity was $17 \text{ units} \pm 1 \text{ unit}$; one unit is defined as the conversion of $1 \mu\text{mol}$ of substrate to product in 1 min per gram of cells wet weight. Plotted are the means and vertical lines represent the SEM of eight different experiments each one performed in triplicate.

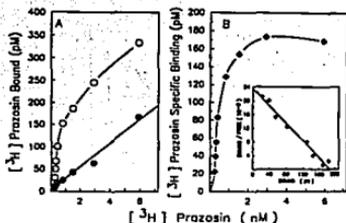


Fig. 7. Binding isotherm and Scatchard analysis of $[^3\text{H}]$ prazosin binding to chicken liver membranes. Membranes were incubated with the indicated concentrations of radioligand in the absence (total binding, open circles) or presence of $10 \mu\text{M}$ phentolamine (non-specific binding, solid circles). In panel B, specific binding (solid diamonds) and the Scatchard analysis (insert) are presented.

25 nM) (see Fig. 8 for a representative displacement study).

Finally, we addressed the point as to whether the α_1 -adrenergic action in chicken hepatocytes was mediated via G-protein(s) sensitive or insensitive to pertussis toxin. For this purpose, chickens were treated with pertussis toxin 3 days before the experiments were performed. We determine that the *in vivo* treatment with the toxin completely ADP-ribosylated the pertussis toxin substrate(s) by performing pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation studies *in vitro*, as shown in Fig. 9 (insert). It can be observed that important endogenous (i.e. in the absence of toxin) labeling takes place in chicken liver membranes (Fig. 9 insert, line 1); however, a clear band of ≈ 4 kDa was observed when pertussis toxin was present in the incubation with membranes from con-

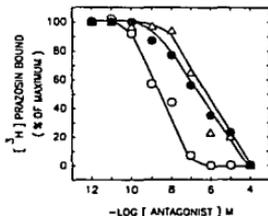


Fig. 8. Competition by α_1 -adrenergic antagonists for $[^3\text{H}]$ prazosin binding sites. Membranes were incubated with $1.5\text{--}2 \text{ nM}$ $[^3\text{H}]$ prazosin and the indicated concentrations of prazosin (open circles), 5-methyl-urapidil (solid circles) or WB4101 (open triangles). Plotted is a representative experiment replicated 4–5 times using different membrane preparations.

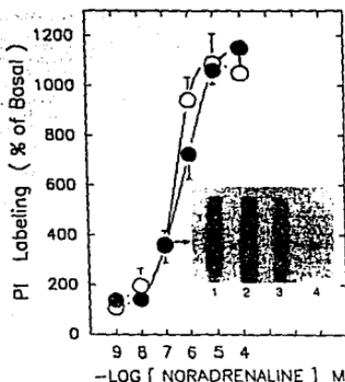


Fig. 9. Effect of pertussis toxin on norepinephrine-stimulated phosphatidylinositol labeling. Hepatocytes from control (open circles) or pertussis toxin-treated (solid circles) chickens were incubated with $10 \mu\text{M}$ propranolol and the indicated concentrations of noradrenaline. Inset: *In vitro* pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation. Line 1, control membranes incubated in the absence of toxin; line 2, control membranes incubated with pertussis toxin; line 3, membranes from pertussis toxin-treated chickens incubated with pertussis toxin; line 4, pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of rat liver membranes

trol animals (line 2). This band was not observed, at all, in liver membranes from pertussis toxin-treated chickens (line 3). Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of rat liver membranes is presented for comparison (Fig. 9 insert, line 4). Such complete modification of the pertussis toxin substrate(s) did not alter the effect of noradrenaline on PI labeling (Fig. 9).

DISCUSSION

In the present study, the subtype of α_1 -adrenoceptors present in chicken hepatocytes, and a signal transduction system to which these receptors are coupled, were characterized using a variety of approaches. It is clear from the results that these receptors are sensitive to chlorethylclonidine and that they have much lower affinity for 5-methyl-urapidil than for prazosin. The data indicate, therefore, that the α_1 -adrenoceptors present in chicken liver cells belong to the α_{1B} -subtype. It is worth noticing that the K_s observed for prazosin (0.2–0.4 nM) and 5-methyl-urapidil (30–60 nM) were in very close agreement and within the range observed in other cells that express α_{1B} -adrenoceptors. Further support to this classification was obtained in the PI studies where it was observed that methoxamine has essentially no activity, which is in accord with what has been

observed in rat hepatocytes that also express the α_{1B} -subtype (García-Sáinz *et al.*, 1985, 1993).

Our present data also indicate that activation of these α_{1B} -adrenoceptors activates the phosphoinositide turnover/calcium mobilization signal transduction process. The data clearly indicate that once these receptors are activated, the second messenger, IP_3 , is produced (putatively via the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by phospholipase C) and that a secondary resynthesis of phosphatidylinositol is produced (classical PI effect) (Berridge and Irvine, 1984; Michell, 1975). There is a large amount of evidence indicating that α_1 -adrenergic-stimulated phosphoinositide turnover involves pertussis toxin-insensitive G-proteins (reviewed in García-Sáinz, 1993). Our present data are consistent with this. However, and as discussed elsewhere (García-Sáinz, 1993; García-Sáinz *et al.*, 1992b) the data do not rule out the possibility that these receptors may activate other signal transduction processes via different G-proteins. There is now clear evidence indicating that a given receptor may modulate more than one signalling pathway. We also presented evidence that such α_{1B} -adrenergic-stimulated phosphoinositide turnover is associated with increases in cytosol calcium and activation of phosphorylase α , as observed in many other cells (Berridge and Irvine, 1984; Cohen, 1982).

We would like to comment about the data using prazosin and WB4101. Prazosin is a very potent and effective irreversible antagonist (Helman *et al.*, 1987); it has been suggested that it has some α_{1A} -adrenoceptor selectivity when it is administered *in vivo* (Piascik *et al.*, 1990). However, no such selectivity has been observed when isolated cells are used (García-Sáinz *et al.*, 1992a; Mante and Minneman, 1991). The discrepancy between *in vivo* and *in vitro* data could be due to pharmacodynamic considerations (tissue distribution/biotransformation). In any case, our data clearly indicate that the α_{1B} -adrenoceptors of chicken hepatocytes are fully inactivated by prazosin. On the other hand, we observed a relatively low affinity for WB4101 (30 nM) in the binding studies, which is within what has been observed for α_{1B} -adrenoceptors in other cells (Morrow and Creese, 1986; García-Sáinz, 1993) and therefore, it is consistent with the classification of the chicken adrenoceptors as belonging to this subtype. We would like to mention that this antagonist was not tested in the whole cell studies because it is very actively metabolized by hepatocytes and therefore, its real potency is very difficult to estimate (Han *et al.*, 1990).

Finally, we would like to discuss the variability that exists in the subtype of α_1 -adrenoceptor expressed in liver cells. The reason for such variability is completely unknown as are the factors that control the expression of these receptors. However, it is clear from our data that there is no "tissue-specific" pattern of expression and that data cannot be

extrapolated without verification from one species to another. We consider the characterization of the hepatic receptors expressed in different species to be of interest since it may give insights on the physiological and evolutive significance of such variation. It is of interest to mention that, for the β -adrenoceptors, it has been observed that the β_1 -adrenoceptor is much less subjected to phosphorylation and desensitization than the β_2 receptor, and it is very possible that such a difference may have physiological implications (Liggett *et al.*, 1993). Activation of protein kinase C with phorbol esters blocks and desensitizes the α_{1B} -adrenoceptor of rat hepatocytes (Corvera and García-Sáinz, 1984; Corvera *et al.*, 1986); interestingly, the α_{1A} -adrenoceptors of guinea pig hepatocytes seem to be much less sensitive to phorbol esters (García-Sáinz *et al.*, 1992b). However, the molecular basis of such difference in sensitivity and its physiological significance are presently unknown. Certainly much more work will be required to clarify these aspects.

Acknowledgements—The authors want to express their gratitude to Mr Manuel Echeverría for generously donating all the chickens used in the present study. They also thank Drs Rafael Villalobos-Molina and Marina Macías-Silva for help and advice with the IP₃ determinations and intracellular calcium measurements, and Gerardo Coello, Ana María Escalante and Fernando López for help with the computer programs. The secretarial help of Mrs Guadalupe Ramírez is gratefully appreciated. This research was partially supported by grants from DGAPA (IN200193) and CONACYT (0310-N9107).

REFERENCES

- Berridge M. J. and Irvine R. F. (1984) Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315–321.
- Berry M. N. and Friend D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 506–520.
- Cheng Y.-C. and Prusoff W. H. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of an inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108.
- Cohen P. (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* **296**, 613–620.
- Corvera S. and García-Sáinz J. A. (1984) Phorbol esters inhibit alpha-adrenergic stimulation of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **119**, 1128–1133.
- Corvera S., Schwarz K. R., Graham R. M. and García-Sáinz J. A. (1986) Phorbol esters inhibit alpha-adrenergic effects and decrease the affinity of liver alpha-adrenergic receptors for (-)-epinephrine. *J. Biol. Chem.* **261**, 520–526.
- Cotecchia A., Schwinn D. A., Randall R. R., Lefkowitz R. J., Caron M. G. and Koblika B. K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 7159–7163.
- García-Sáinz J. A. (1987) Pathways of the α_1 -adrenergic action. Comparison with V_1 -vasopressin and A_1 -angiotensin. *Circ. Res.* **61** (suppl II): 1–5.
- García-Sáinz J. A. (1993) α_1 -Adrenergic action, receptor subtypes, signal transduction and regulation (Minireview). *Cell. Signalling* (in press).
- García-Sáinz J. A., Huerta-Bahena M. E. and Malbon C. C. (1989) Hepatocyte β -adrenergic responsiveness and guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Am. J. Physiol.* **256**, C384–C389.
- García-Sáinz J. A., Macías-Silva M., Hernandez-Sotomayor S. M. T., Torres-Marquez M. E., Trivedi D. and Hruby V. J. (1990) Modulation of glucagon actions by phorbol myristate acetate in isolated hepatocytes. Effects of hypothyroidism. *Cell. Signalling* **2**, 235–243.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Alcantara-Hernandez R. and Macías-Silva M., Olivares-Reyes A. and Gonzalez-Espinoza C. (1992) Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptors: α_{1A} , α_{1B} and α_{1C} subtypes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **186**, 760–767.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Alcantara-Hernandez R. and Olivares-Reyes A. (1993) Different sensitivity to methoxamine and oxymetazoline of hepatocytes expressing α_{1A} , α_{1B} or α_{1C} -adrenoceptors. *Pharmacol. Commun.* **2**, 339–344.
- García-Sáinz J. A., Romero-Avila M. T., Olivares-Reyes A. and Macías-Silva M. (1992) Guinea pig hepatocyte α_{1A} -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 239–245.
- García-Sáinz J. A., Villalobos-Molina R., Corvera S., Huerta-Bahena J., Tsujimoto G. and Hoffman B. B. (1985) Differential effects of adrenergic agonists and phorbol esters on the alpha₁-adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **112**, 393–397.
- Han C., Wilson K. M. and Minneman K. P. (1990) α_1 -Adrenergic receptor subtypes and formation of inositol phosphates in dispersed hepatocytes and renal cells. *Molec. Pharmacol.* **37**, 903–910.
- Helman J., Kusiak J. W., Pitha J. and Baum B. J. (1987) Inhibition of α_1 -adrenergic responsiveness in intact cells by a new irreversible receptor antagonist. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **142**, 403–409.
- Liggett S. B., Freedman N. J., Schwinn D. A. and Lefkowitz R. J. (1993) Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric β_1/β_2 -adrenergic receptor. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3665–3669.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Mante S. and Minneman K. P. (1991) The alkylating prazosin analog SZL 49 inactivates both α_{1A} - and α_{1B} -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **208**, 113–117.
- Michell R. H. (1975) Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. biophys. Acta* **415**, 81–147.
- Minneman K. P. (1988) α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* **40**, 87–119.
- Morrow L. A. and Creese I. (1986) Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [³H]WB4101 and [³H]prazosin binding. *Molec. Pharmacol.* **29**, 321–330.
- Neville D. M., Jr (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell surface membrane of rat liver. *Biochim. biophys. Acta* **154**, 540–552.
- Perez D. M., Piascik M. T. and Graham R. M. (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an α_{1B} -adrenergic receptor cDNA. *Molec. Pharmacol.* **40**, 876–883.
- Piascik M. T., Butler B. T., Pruitt T. A. and Kusiak J. W. (1990) Agonist interaction with akyltion-sensitive and -resistant alpha₁-adrenoceptor subtypes. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **254**, 982–991.
- Schwinn D. A. and Lomasney J. W. (1992) Pharmacologic characterization of cloned α_1 -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype. *Eur. J. Pharmacol.* **227**, 433–436.

- Schwinn D. A., Lomasney J. W., Lorenz W., Sklut P. J., Francau RT J., Yang-Feng T. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. and Cotecchia S. (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenoreceptor subtype. *J. Biol. Chem.* **265**, 8183-8189.
- Schwinn D. A., Page S. O., Middleton J. P., Lorenz W., Liggett S. B., Yamamoto K., Lapetina E. G., Caron M. G., Lefkowitz R. J. and Cotecchia S. (1991) The α_{1C} -adrenoreceptor: Characterization of signal transduction pathway and mammalian tissue heterogeneity. *Molec. Pharmacol.* **40**, 619-626.
- Sekura R. D., Fish F., Manclark C. R., Meade B. and Zhang Y.-L. (1983) Pertussis toxin. Affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **258**, 14,647-14,651.
- Stalmans W. and Hers H.-G. (1975) The stimulation of liver phosphorylase b by AMP, fluoride and sulfate. *Eur. J. Biochem.* **54**, 341-350.
- Sulakhe S. J., Puiga V. B. and Tran S. (1988) Hepatic α_1 and β -adrenoreceptors in various animal species. *Molec. Cell. Biochem.* **83**, 81-88.
- Torres-Marquez M. E., Villalobos-Molina R. and Garcia-Sáinz J. A. (1991) α_1 -Adrenoreceptor subtypes in aorta (α_{1A}) and liver (α_{1B}). *Eur. J. Pharmacol.* **206**, 199-202.

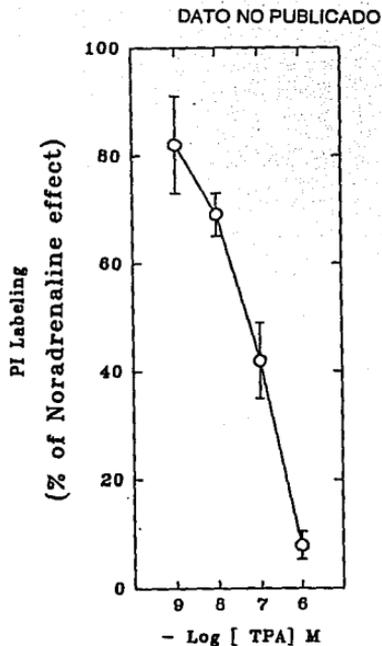


Fig. 1 Efecto del 12-tetradecanoil-forbol-acetato (TPA) sobre el marcaje de fosfolinosfidos estimulado por noradrenalina.

Hepatocitos de pollo se incubaron con $10 \mu\text{M}$ de propranolol y $10 \mu\text{M}$ de noradrenalina en presencia de las concentraciones indicadas de TPA. La gráfica es el promedio de 7 diferentes experimentos por triplicado.

DATO NO PUBLICADO

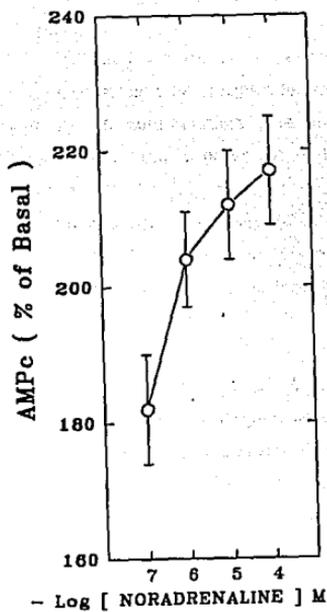


Fig. 2 Efecto de noradrenalina sobre la acumulación de AMPc.

Hepatocitos de pollo se incubaron durante 2 minutos en presencia de propranolol $10 \mu\text{M}$ y a las dosis indicadas de noradrenalina. La gráfica es el promedio de 4 diferentes experimentos por triplicado.

RESUMEN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos descritos en la sección anterior podrían sintetizarse de la siguiente manera:

1) Se observó que la noradrenalina y la adrenalina estimularon el marcaje de fosfoinosítidos de una manera dependiente de la dosis y a concentraciones máximas se observaron incrementos de aproximadamente diez veces sobre la actividad basal. Al utilizar fenilefrina se encontró que la estimulación era menor y no saturable. Y en la misma serie de experimentos se estableció que la metoxamina, agonista α_1 , no mostró efectos sobre el marcaje de fosfoinosítidos (fig. 1).

2) En otra serie de determinaciones quedó claro que al preincubar los hepatocitos de pollo en presencia de 2 antagonistas irreversibles, el primero de ellos, que es la cloroetilclonidina, provocaba una importante disminución en el marcaje de fosfoinosítidos en comparación a los hepatocitos estimulados con noradrenalina. La preincubación con prazosina bloqueó completamente el marcaje de fosfoinosítidos (fig. 2).

3) Se demostró así mismo que prazosina y 5-metilurapidil, dos antagonistas de acción reversible, eran capaces de bloquear la estimulación inducida por Noradrenalina sobre el marcaje de fosfoinosítidos, siendo más potente la Prazosina que el 5-metilurapidil (fig.3). Resultados similares se obtuvieron al utilizar como parámetro la activación de la fosforilasa A (fig 6).

4) Se vió también que la noradrenalina estimula la producción de inositol trifosfato y movilización de calcio y que el 5-metilurapidil puede bloquear la

producción de estos segundos mensajeros (figs. 4 y 5) . Por lo que se refiere a la cuantificación de inositol trifosfato encontramos que prazosina presentaba mayor potencia en bloquear la estimulación inducida por noradrenalina en relación al 5-metilurapidil.

5) Se efectuaron también estudios de asociación y competencia en membranas de hígado de pollo con [^3H] prazosina. El análisis de Scatchard presentó un gráfico lineal y un sólo sitio de receptores α_1 (fig 7). Y para los estudios de competencia el orden de potencia fue : prazosina > WB4101 > 5-metilurapidil (fig. 8).

6) Se estableció que la estimulación inducida por noradrenalina en el marcaje de fosfoinosítidos no es sensible al tratamiento con la toxina *pertussis* (fig. 9).

7) Por último se observó que la respuesta $\alpha_1\beta$ en hepatocitos de pollo disminuye al activar a la proteína cinasa C con concentraciones crecientes de TPA (datos no publicados fig.1) y puede además producir incrementos de adenosín monofosfato cíclico. (datos no publicados fig. 2)

DISCUSION

Como se ha dicho en las líneas anteriores el móvil fundamental de este trabajo consistió en la caracterización del receptor α_1 adrenérgico en hepatocitos de pollo. Los datos obtenidos mostraron que el receptor en cuestión pertenece al subtipo α_{1B} . En la fase inicial de este proyecto se observó la acción de diversos agonistas sobre el recambio de fosfoinosítidos y se encontró que la adrenalina y la noradrenalina incrementaban el marcaje de fosfoinosítidos hasta diez veces sobre la actividad basal en hepatocitos de pollo. Al comparar estos datos con los reportados sobre hepatocitos de rata se observaron incrementos entre cinco y siete veces superiores. Estas diferencias obedecen, quizá, a que en hepatocitos de pollo las células obtenidas presentaron siempre de un noventa y nueve a un cien por ciento de viabilidad, lo que se determinó por exclusión con azul de tripano. Se vió además, durante la manipulación e incubación, que las células conservaron siempre el mismo porcentaje de viabilidad. Es decir, se trata de células muy resistentes al manejo experimental en comparación a los hepatocitos de rata.

De gran importancia, por su valor estratégico en los estudios de caracterización subsecuentes, fue observar que la metoxamina (agonista α_{1A}) no ejercía ningún efecto sobre el marcaje de fosfoinosítidos, resultado que es muy similar a lo obtenido en hepatocitos de rata, donde se expresa el subtipo B. Al utilizar el mismo agente, en hepatocitos de cuyo, por otra parte, se observó algún efecto en dosis altas y en hepatocitos de conejo se observó incremento de manera dependiente de la dosis.

Con la finalidad de proseguir los trabajos de caracterización se decidió estudiar las acciones farmacológicas de agonistas irreversibles sobre recambio

de fosfoinosítidos. Los receptores mostraron ser sensibles al tratamiento con cloroetilclonidina y con prazobind. Es interesante hacer notar que inicialmente el prazobind había sido reportado como un antagonista selectivo α 1A. Posteriormente, sin embargo, se publicaron evidencias de que el fármaco citado no presentaba selectividad, al menos *in vitro*, entre el receptor α 1A y B (132). Lo anterior nos llevó a explorar la acción de dos antagonistas de acción reversible que nos indicaran con mayor certeza el probable subtipo de receptor implicado en nuestro sistema. Encontramos que prazosina exhibía una marcada afinidad en bloquear el recambio y la actividad de la fosforilasa a en comparación al 5 metilurapidil. Los datos obtenidos hasta el momento nos sugerían de modo tajante que el subtipo de receptor α 1 en hepatocitos de pollo correspondía al α 1B.

Para corroborar los datos cosechados hasta este momento nos vimos obligados a planear otra serie de experimentos que indicaran de manera más fehaciente el subtipo de receptor presente en hepatocitos de pollo, por lo que recurrimos a estudios de asociación utilizando como ligando prazosina tritiada. Los receptores mostraron alta afinidad por el ligando y un número de sitios muy similar al reportado por otros autores (130). Realizando estudios de competencia establecimos que el compuesto que presentaba mayor afinidad era la prazosina y que WB-4101 y 5 metil urapidil presentaban baja afinidad. Las constantes de inhibición obtenidas para estos dos últimos compuestos fueron muy similares a las reportadas por otros autores (129) en donde estudiaron la respuesta α 1B (0.4 nM para prazosina, 30 nM para WB-4101 y 45 nM para 5-MU). Todo ello indicaba de modo pronunciado que el receptor pertenecía al subtipo α 1B.

Una vez que hablamos establecido el subtipo de receptor quisimos averiguar si se encontraba acoplado al recambio de fosfoinosítidos-calcio. Para ello utilizamos diversas técnicas que nos permitieran corroborar el hecho

anterior. En primer lugar medimos la producción de dos de los segundos mensajeros generados por este sistema de transducción: inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y calcio, estimulando al sistema con noradrenalina. La acción de la hormona, que estimuló la producción de IP_3 de manera dependiente de la dosis, fue bloqueada por la prazosina y se requirieron dosis más grandes de 5-metilurapidil para bloquear las mismas acciones. Estos datos fueron similares a los recogidos en las determinaciones de recambio de fosfoinosítidos y en la actividad de la fosforilasa-a, lo cual verificaba nuestros datos anteriores y además indicaba que el receptor efectivamente se encontraba acoplado al sistema. Observamos también que la movilización de calcio fue promovida por la noradrenalina y se pudo prevenir casi en su totalidad utilizando 5 metilurapidil en concentraciones de $10 \mu M$ en el ensayo.

Otro ensayo que estábamos obligados a realizar exigía la utilización de la prazosina, lo que no fue posible llevar a cabo, porque lamentablemente y debido a sus propiedades fluorescentes, interfería de manera muy importante con el ensayo enmascarando totalmente la señal. Observamos también que la producción de estos segundos mensajeros ocurre a través de una proteína G que es insensible al tratamiento por toxina *pertussis*.

Como existían diversos reportes (127) en donde se sugería que la proteína cinasa C podía fosforilar al receptor en residuos específicos de serina y treonina modulando con ello la capacidad del receptor para acoplarse al sistema, decidimos investigar si en nuestro modelo la cinasa mencionada podía modular la respuesta α_1 adrenérgica. Para ello recurrimos al empleo del TPA para activar directamente a la proteína cinasa C. Encontramos que el TPA bloqueó completamente el recambio de fosfoinosítidos, lo que sugiere que el receptor es sustrato de la proteína cinasa C. Si consideramos que en sistemas como el del cuyo la sensibilidad al tratamiento con ésteres de forbol es mucho menos potente, no sería excesivo afirmar que la secuencia aminoacídica y la

estructura terciaria del receptor α_1 podría ser determinante en la afinidad de la proteína cinasa C por su sustrato.

Se ha reportado además que el receptor α_{1B} transfectado en células COS-7 puede incrementar los niveles intracelulares de AMPc. En el presente trabajo hemos recogido datos que sugieren también que el receptor podría acoplarse de forma positiva a la adenilato ciclasa pero aún se requiere de indagaciones más detenidas para corroborar, con un grado aproximado de certidumbre, si el receptor, por sí sólo, activa a la adenilato ciclasa o lo hace a través de la cascada de segundos mensajeros producidos por la activación del receptor alfa 1 adrenérgico.

Es importante señalar que los diversos tipos de receptores α_1 adrenérgicos se expresan en diferentes especies pero en los mismos tejidos. El receptor α_{1A} adrenérgico, por ejemplo, se expresa en hepatocitos de ratón, el α_{1B} en hepatocitos de rata y el α_{1C} en hepatocitos de conejo. En la actualidad no se han desentrañado aún los patrones que rigen la aparición de uno u otro de los subtipos en cada una de las especies. Se sabe, en cambio, que la expresión del receptor α_{1B} es predominante en tejido hepático. Todavía están por esclarecerse las estrategias que observó la naturaleza para elegir, entre los subtipos conocidos, aquél que representara mayores ventajas evolutivas en cada caso determinado. Sin embargo no sería temerario especular que la diferencia en patrones cinéticos y de regulación de la respuesta se hallara implicada entre las causas que determinaron la selección de cada uno de los subtipos en cada uno de los casos considerados.

Por otro lado, la velocidad apabullante del conocimiento en el campo de los adrenoreceptores se ha potenciado más aún gracias a la gran diversidad y selectividad de drogas destinadas a definir nuevos subtipos de receptores que hasta un cierto momento permanecían en un estado de relativa ambigüedad. En apariencia, el mecanismo de transducción es muy semejante en todos estos

subtipos, pero no es improbable que cada uno de ellos responda, en última instancia, a modificaciones microambientales y a otras características aún desconocidas, de las que podría depender de modo sustancial la especificidad de cada uno de los tejidos comprometidos en la respuesta. Se ha encontrado, por ejemplo, que hay ciertos tejidos que a lo largo de su desarrollo van expresando distintos subtipos de receptores adrenérgicos como una forma, tal vez, de responder con más eficacia a los desafíos de las fases más tempranas del crecimiento. Resulta evidente, de todo lo dicho, que la expansión incontenible de nuevos fármacos no sólo impulsará de modo vibrante la investigación en el campo sino que se reflejará de una manera muy positiva en el tratamiento de padecimientos que hasta el día de hoy siguen rehuyendo los beneficios de la medicina moderna. Diremos, por último, que no sería imposible que algunas de las técnicas empleadas a lo largo de estas indagaciones puedan servir en el futuro para acometer problemas, hasta hoy insolubles, relacionados con la estructura de las proteínas y el hecho prodigioso de que la alteración de un sólo aminoácido pueda dañar de modo irreparable la coherencia de todo el mensaje genético (134).

SUMMARY

In the present study the characterization of α_1 adrenoceptors was done in isolated cells obtained from chicken liver. In the first part of this work, we studied the α_1 adrenergic stimulation of phosphatidylinositol labeling, observing the following potency order for agonists: Adrenaline = Noradrenaline > Phenylephrine. Methoxamine was not capable of stimulating phosphatidylinositol labeling. The stimulation induced by Noradrenaline was blocked by prazosin, whereas chloroethylclonidine only partially inhibited this response. Regarding to reversible antagonists, prazosin was more potent than 5-methylurapidil for inhibiting the Noradrenaline action on the phosphatidylinositol. Similar results were obtained when the activity of phosphorylase a was assayed. These data suggest that the α_1 adrenergic receptors of chicken hepatocyte belong to the subtype B. The afore mentioned was confirmed by binding competition experiments revealing a potency order as follows: Prazosin > WB4101 > 5-methylurapidil.

It is also observed that stimulation of α_1 adrenergic receptors stimulates inositol triphosphate production and calcium mobilization and that these actions were inhibited by 5-methylurapidil. Prazosin showed higher affinity and potency in blocking noradrenaline mediated production of inositol triphosphate.

The results obtained lead us to conclude that in isolated hepatocytes from chicken, the α_1 adrenergic receptor corresponds to the subtype B, and the GTP binding protein coupled to this system is not sensible to the action of *pertussis* toxin.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- García-Sáinz, J.A. (1985) Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular. FCE, SEP. México 108 pp.
- 2.- García-Sáinz, J.A. (1987) Mensaje Bioquímico vol. X, 177-210 pp.
- 3.- Darnell, Lodish y Baltimore. Molecular Cell Biology. Scientific American press.
- 4.- Williams, R.H. (1987) Tratado de Endocrinología . 6a. ed.. Ed. Interamericana.
- 5.- Oliver, G. y Shaffer, E.A. (1895) The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. J. Physiol. 18: 230-237.
- 6.- Abel, J.J. and Crawford, A.C. (1897) On the blood-pressure raising constituent of the suprarenal capsule. Bull. John Hopkins Hosp. 8: 151-157.
- 7.- Hartung, W.H. (1931) Epinephrine and related compounds: influence of structure on physiologic activity. Chem. Rev. 9: 398-465.
- 8.- Alquist, R.P. (1948) A study of the adrenotropic receptors. Am. J. Physiol. 153: 586-600.
- 9.- Lands, A.M. , Arnold, A., Mc., Auliff, J.P., Luduena, F.P., Brown, T.C. (1967) Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. Nature. 214: 597-598.
- 10.- Furchott, R.F. (1959) The receptors for epinephrine and norepinephrine (adrenergic receptors). Pharmacol. Rev. 11: 429-441.
- 11.- Brown, G.L. y Gillispie, J.S. (1957) The output of sympathetic transmitter from the spleen of the cat. J. Physiol. 138: 81-102.
- 12.- Langer, S.Z. (1977) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. Br. J. Pharmacol. 60: 481-497.
- 13.- Berthelsen, S. y Pettinger, W.A. (1977) A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. Life Sci. 21: 595-606.
- 14.- Williams L.T. y Lefkowitz , R.J. (1976) Alpha-adrenergic receptor identification by [³H] dihydroergocryptine binding. Science 192:791-793.
- 15.- Yamamura, H.I., Enna, S.J., and Kuhar, M.J. (1985) Neurotransmitter Receptor Binding Raven, New York.
- 15a.- Cheung, A.H., Huang, R.R. y Strader, C.D. (1992) Involvement of specific hydrophobic, but no hydrophilic, aminoacids in the third intracellular loop of the beta-adrenergic receptors in the activation of Gs. Mol. Pharmacol. 41 (6): 1061-1065.
- 16.- Fain, J. y García-Sáinz, J. A. (1980) Role of phosphatidylinositol turnover in alpha-1 and of adenylate cyclase inhibition in alpha-2 effects of catecholamines. Life Sci. 26 :1183-1194.

- 17.- Sabol, S.L. and Nirenberg, M. (1979) Regulation of Adenylate Cyclase of Neuroblastoma x Glioma hybrid cells by α -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **254**: 1913-1920.
- 18.- Jones, L.M. y Mitchell, R.H. (1978) Stimulus response coupling at α -adrenergic receptors. *Biochem. Soc. Trans.* **6**: 672-688.
- 19.- Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1988) Adrenergic Receptors: Modrels for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **263**: 4993-4996.
- 20.- Dohlman, H.G., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26**: 2657-64.
- 21.- Hargrave, P., McDowell, J.H., Feldman, R.J., Atkinson, P.H., Rao, J.K.M. and Arges, P. (1984) Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Res.* **24**: 1487-1499.
- 22.- Dohlman, H.G., Bouvier, M., Benovic, J.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1987) The multiple membrane spanning topography of the β_2 -adrenergic receptor: Localization of the sites of binding, glycosilation and regulatory phosphorylation by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **262**:14282-14288.
- 23.- Wang, H-Y, Lippert, L., Malbon, C.C. y Bahohouin, S. (1989) Site directed antipeptide antibodies define the topography of the beta-adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* **264**: 14424-14430.
- 24.-Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1987) Molecular and regulatory properties of adrenergic receptors. *Recent. Prog. Horm. Res.* **43**: 469-479.
- 25.- Emorine, L.J., Marullo, S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., Tate, K, Delavier-Klutchko, C., Stronsberg, A.D: (1989) Molecular characterization of the human β_3 -adrenergic receptor. *Science* **245**: 1118-1121.
- 26.- Schwinn, D.A., Lomasney, J.W., Lorenz, W., Szlutt, P., Freneau, S., R.T., Jr., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., y Cotecchia, S. (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.* **265**: 8183.
- 27.- Lomansney, J.W., Lorenz, W., Allen, L.F., King, K., Regan, J.W., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1990) Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5094.
- 28.- Minneman, K. P. y Molinoff, P.B. (1980) Classification and quantitation of beta-adrenergic receptors subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **29**: 1317-1323.
- 29.- Nahorski, S.R. (1981) Understanding Receptor. Elseiver/ Worth Holland Biochemical Press. 71-77.
- 30.- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Stader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G. (1986) Cloning of the gene and cDNA for the mammalian beta2-adrenergic receptor and homology with rodopsin. *Nature* **321**: 75-79.

- 31.- Harwood, J.P. y Rodbel, M. (1973). Stimulatory and inhibitory effects of guanyl nucleotides on fat cells adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 248: 6239-6245.
- 32.- Rodbell, M., Krans, H.M., Pohl, L., Birbaumer, L. (1971) The glucagon sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. Effects of guanyl nucleotides on the binding of [¹²⁵I] glucagon. *J. Biol. Chem.* 246: 1872-1876.
- 33.- Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y. (1974). Evidence for independent action for glucagon and nucleotides on the hepatic adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 249: 59-65.
- 34.- Sternweis, P.C., Northup, J.K., Smigel, M.D., Schlieger, L.S., Ross, E.M., Gilman, A.G. (1980) Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6516-6519.
- 35.- Gilman, A.G. (1987) G-Proteins: Transducers of receptors generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- 36.- Katada, T., Northup, J.K., Bokoch, G.M., Ui, M., Gilman, A.G. (1984) The inhibitory guanine nucleotide binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259: 3378-3585.
- 37.- Birbaumer, L., Codina, J., Mattera, R., Cerione, R.A., Hildebrand, J.D., Sunyer, T., Rojas, F.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Iyengar, R. (1985) Molecular mechanism of transmembrane signaling. Cohen & Houslay Ed. Elsevier. 3-56pp.
- 38.- Casey, P.J., Gilman, A.G. (1988) Involment in receptor effector coupling. *J. Biol. Chem.* 263: 2577-2582.
- 39.- Mumby, S., Rang, H., Gilman, A.G., Sternweis, P.C. (1988). Chromatografic resolution and immunologic identification of the alpha 40 and alpha 41 subunits of guanine nucleotide binding regulatory protein from bovine brain. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 (4): 2020-2026.
- 40.- Hescheler, J.W., Rossenthal, W., Trautwien, W., Schultz, G. (1987) The GTP-binding protein, Go regulates neuronal calcium channels. *Nature* 325: 445-448.
- 41.- Ewald, D.A., Sternweis, P.C., Miller, R.J. (1988) Guanine nucleotide binding protein Go-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca⁺⁺ channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3633-3638.
- 42.- Tang, W.J. y Gilman, A.G. (1992) Adenylyl Cyclases. *Cell* 70: 869-872.
- 43.- Bakalyar, H.A. y Reed, R.R. (1990) Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250: 1403-1406.
- 44.- Tang, W. y Gilman, A.G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G-protein. *Science* 254: 1500-1503.
- 45.- Gao, B.N. y Gilman, A.G. (1991) Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 10178-10182.
- 46.- Krebs, E.G., Blumenthal, D.K., Edelman, A.M., Hales, C.N. (1985). In *Mechanisms of Receptor Regulation*. Ed. Poste 159-195.

- 47.- Zoller, M.J., Kerlavage, A.R., Taylor, S.S. (1979) Structural comparisons of cAMP dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscles. *Biol. Chem.* 254: 2408-2412.
- 48.- Uhler, M.D., Chirivia, J.C., Mc Knight, C.S. (1980) *J. Biol. Chem.* 261: 15360-15363.
- 49.- Bouvier, M., Hausdorff, W.P., De-Biasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilla, B.F. (1988). Removal of phosphorylation sites from the β_2 - adrenergic receptor delays onset of agonist promoted desensitization. *Nature* 333: 370-373.
- 50.- Dohlman, H.G., Thornes, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991) Model system for the study of the seven transmembrane segments receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 653-688.
- 51.- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986). β -Adrenergic receptor kinase: Identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 2797-2801.
- 52.- Benovic, J.L., Kunn, H. Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: Potential role of an analog of the retinal binding protein arrestin (48-kDa). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8879-8882.
- 53.- Lomansney, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1991) Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Bioch. Biophys. Acta* 1095:127-139.
- 54.- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Fanke, U., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Regan, J.W. (1987) Cloning sequencing and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2 adrenergic receptor. *Science* 238: 650-656.
- 55.- Lomansney, J.W., Lorenz, W., Allen, L.F., King, K., Regan, J.W., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G. y Lefkowitz, R.J. (1990) Expansion of the α_2 -adrenergic receptor family: cloning and characterization of a human α_2 -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5094-5098.
- 56.- Lanier, S.M., Honay, C.J., Patenande, C. y Graham, R.M. (1988) Identification of structurally distinct alpha-2 adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 263: 14491-14496.
- 57.- Zeng, D., Harrison, J.K., D'angelo, D.D., Barber, C.M., Tucker, A.L., Lu, Z. y Lynen, K.R. (1990) Molecular characterization of a rat alpha 2B-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:3102-3106.
- 58.- Benovic, J.L., Regan, J.W., Matsui, H. Mayor, F., Cotecchia, S., Leeb-Lundberg, L-M.E., Caron, M.G. y Lefkowitz, R. J. (1987) Agonist-

- dependent phosphorylation of the α_2 -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 17251-17253.
- 59.- Aghajanian, G.K. y Vandermaelen, C.P. (1982) Alpha 2 adrenoceptors mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* 215: 1394-1396.
- 60.- Holz, G.G. 4th., Rahe, S.G. y Dunlap, K. (1986) The GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature* 319:670-672.
- 61.- Isom, L.L. , Cragoe, E.J. y Limbird, L.E. (1987) Alpha2-adrenergic receptors accelerate Na⁺/H⁺ exchange in neuroblastoma x glioma cells. *J. Biol Chem.* 262: 6750-6757.
- 62.- Michel, M.C., Brass, L.F. , Williams, A., Bokoch, G.M. , La Morte, W.J. y Motulsky, H.J. (1989) Alpha2 adrenergic receptor stimulation mobilizes intracellular Ca⁺⁺ in human erythroleukemia cells. *J. Biol. Chem.* 264: 4986-4991.
- 63.- Eide, B., Gierschik, P., Milligan, G. , Mullaney, I., Unson, C. Goldsmith, P., Spiegel, A.A. (1987) GTP-binding proteins in brain and neutrophil are tethered in the plasma membrane via their amino terminl. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148 (3): 1398-1405.
- 64.- Spiegel, A.A., Gierschik, P., Levine, M.A., Downs, R.W. Jr. (1985) Clinical implications of guanine nucleotide binding proteins as receptor effector couplers. *N. Engl. J. Med.* 312 (1): 26-33.
- 65.- Spiegel, A.M., Simonds, W.J., Jones T.L., Goldsmith, P.K. y Unson, C.G., (1990) Antibodies as probes of G-protein receptor-effector coupling and of G-protein membrane attachment. *Biochem. Soc. Symp.* 56: 61-69.
- 66.- Weistein, L.S., Kats, I., Spiegel. A.M. y Carter, A.D. (1990) Characterization of the promoter of the human Gi2 alpha subunit gene. *Mol. Endocrinol.* 4(7): 958-964.
- 67.- Hildebrandt, S.D., Codina, J., Birbaumer, L. (1984) Interaction of the stimulatory and inhibitory regulatory proteins of the adenylyl cyclase system with the catalytic component of cyc.s49 cell membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 13178-13185.
- 68.- García-Sáinz, J.A. , Boyer, J.L., Michel, T., Sawyer, D., Stiles, G.L., Dolhman, H., Lefkowitz, R.J. (1984) Effect of pertussis toxin of alpha-2 adrenoceptors; decreased formation of the high affinity state for agonists. *FEBS Lett.* 172: 95-98.
- 69.- Katada, T. y Uj, M. (1982) ADP ribosylation of the specific membrane protein of C5 cells by Iset activating protein associated with modification of adenylyl cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 257: 7210.
- 70.- Greenberg, D.A., U'Prichard, D.C. y Snyder, S.H. (1976) Alpha noradrenergic receptor binding in mammalian brain: Differential labeling of agonist and antagonist states. *Life Sci.* 19: 69-76.

- 71.- Greengrass, P. y Breemner, R. (1979) Binding characteristics of [³H]-prazosin to rat brain α -adrenergic receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 55 : 323-326.
- 72.- Minneman, K.P., Fox, A.W. y Abel, P.W. (1983) Occupancy of alpha-1-adrenergic receptors and contraction of rat vas deferens. *Mol. Pharmacol.* 23: 359-368.
- 73.- Le Crerc, G.B., Rouot, J., Schwartz, J., Veily y Wermuth, C.G. (1980) Studies of some para-substituted clonidine derivatives that exhibit an α -adrenoceptor stimulant activity. *Br. J. Pharmacol.* 71:5-9.
- 74.- Morrow, A.L. y Creese, I. (1986) Characterization of α 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: A reevaluation of [³H] prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* 29:321.
- 75.- Han, C., Abel, P.W. y Minneman, K.P. (1987) Heterogeneity of α 1-adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* 32:505.
- 76.- Han, C. Abel, W. y Minneman, K.P. (1987) α 1-adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca²⁺ in smooth muscle. *Nature* 329: 333-335.
- 77.- Gross, G., Hanft, G. y Regevic, C. (1988) Urapidil and some analogues with hypotensive properties show high affinities for 5-hydroxytryptamine (5-HT) binding sites. *Eur. J. Pharmacol.* 172:131.
- 78.- Michel, A.D., Loury, D.N., y Whiting, R.L. (1989) Difference between the α 1-adrenoceptors in rat submaxillary gland and the α 1A and α 1B adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 98:883.
- 79.- García-Sáinz, J.A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Baena, J., Tsujimoto, G. y Hoffman, B. (1985) Differential effects of adrenergic agonist and phorbol esters on the α 1-adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 393-397.
- 80.- Torres- Marquez, M.E., Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz, J.A. (1991) Alpha1 adrenoceptor subtypes in aorta (α 1A) and liver (α 1B). *Eur. J. Pharmacol.* 200:199-202.
- 81.- Torres-Marquez, M.E., Romero-Avila, M.T. Claudia González-Espnosa Claudia y García-Sainz, J.A. (1992) Characterization of rat white fat cells alpha 1B adrenoceptor. *Molecular Pharmacol.* 42: 403-406.
- 82.- Cotecchia, S., Schwin, D.A., Randal, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. y Kobilka, B.K. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 7159-7163.
- 83.- Schwin, D.A., Lomansney, J. W., Lorenz, W., Szkut, P. J., Fremeau, R.T., Jr., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R. J. y Cotecchia, S. (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 265: 8183-8189.
- 84.- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W., Y., schwin, D.A., Yany-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1991)

- Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem.* 266: 6365-6369.
- 84a.-Cotecchia S., Ostrowski J., Kjelsberg M. A., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1992) Discrete amino acid sequences of the alpha1- adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphoinositol hydrolisis.. *Biol. Chem.* 267, 1663-1639.
- 84b.-Kjelsberg M. A., Cotecchia S., Ostrowski J., Caron M. G. and Lefkowitz R. J. (1992) Constitutive activation fo the alpha 1B adrenergic receptor by all amino acid subunits at a sigle site. *J. Biol. Chem.* 267, 1430-1433.
- 85.- Perez, M.D., Plascik, M.T. y Graham, R.M. (1991) Solution phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 40: 876-883.
- 86.- Perez, D.M., Deyoung, M.B., y Graham, R.M. (1993) Coupling of expressed alpha (1B)-adrenergic and alpha (1D)-adrenergic Receptors to multiple signaling pathways is both G-protein and cell type specific. *Molec. Pharmacol.* 44: 784-795.
- 87.- Banno, Y., Nakashima, S., Tohmatsu, T., Nozawa, Y. y Lapetina , E.G. (1986) GTP and GDP will stimulate platelet cytosolic phospholipase C independently of Ca^{2+} *Biochem. Biophys. Com. Res.* 140: 728-734.
- 88.- Deckmyn, H., Tu, S.M. y Majerus, P.W. (1986) Guanine nucleotides stimulate soluble phosphoinositide specific phospholipase C in the absence of membranes. *J. Biol. Chem.* 261: 16553-16558.
- 89.- Baldassare, J.J., Knipp, M.A., Henderson, P.A. y Fisher, G.J. (1988) GTP-gamma S stimulated hydrolisis of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate soluble phospholipase C from human platelets requieres soluble GTP binding prtoein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 351-357.
- 90.- Camps, M., Hou, C., Jacobs, K.H. y Greischik, P. (1990) Guanosine 5'-[gamma-thio] triphosphate stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5 biphosphate in HL-60 granulocytes. Evidence that the guanine nucleotide acts by relieving phospholipase C from an inhibitory constraint. *Biochem. J.* 271:743-748.
- 91.- Litosh, I. y Fain, J. N. (1985) 5-hydroxytryptamine stimulates inositol phosphate production in a cell-free system from blowfly salivary glands. Evidence for a role of GTP in coupling receptor activation to phosphoinositide breakdown. *J. Biol Chem.* 260: 5464-5471.
- 92.- Litosh, I. y Fain, J.N. (1985) 5-methyltryptamine stimulates phospholipase C mediated breakdown of exogenous phosphoinositides by blowfly salivary gland membranes. *J. Biol. Chem.* 260: 16052-16055.
- 93.- Sasaguri, T., Hirata, M., Itoh T., Koga, T., y Kuriyama, H. (1986) Guanine nucleotide binding protein involved in muscarinic responses in the pig coronary artery in insensitive to islet activating protein. *Biochem. J.* 239: 567-574.

- 94.- Fulle, H.J. y Rosenthal, W. (1987) In vitro synthesis of [32P] labelled phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate and its hydrolysis in smooth muscle membranes and phospholipase C. *Biochem Biophys. Res. comun.* 145: 763-679.
- 95.- Roth, B.L. (1987) Modulation of phosphatidylinositol 4,5, bisphosphate hydrolysis in rat aorta by guanine nucleotide calcium and magnesium. *Life Sci.* 41: 629-634.
- 96.- Magnaldo, I., Talwar, H., Anderson, W.B. y Pouyssegur, J. (1987) GTP-binding protein coupling thrombin receptor to PIP2 phospholipase C in membranes of hamster. *FEBS Lett.* 210: 1-6.
- 97.- Claro, E., Wallace, M.A., Lee, H. L. y Fain, J. (1989) Carbachol in the presence of guanosine 5'-o-(3- Thiotriphosphate) stimulates the breakdown of exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol by rat brain membranes. *J. Biol. chem.* 264:18288-18295.
- 98.- Baer, H. y Saibil, H. (1988) Light and GTP activated hydrolysis of phosphatidylinositol trisphosphate in squid photoreceptor membranes. *J. Biol Chem.* 263:17-20.
- 99.- Portilla, D., Morrissey, J. y Morrison, A.R. (1988) Bradikinin activated membrane associated phospholipase C in madin darby canine kidney cells. *J. Clin Invest.* 81: 1896-1902.
- 100.- Taylor, S.J. y Exton, J.H. (1987) Guanine nucleotide and hormone regulation and polyphosphoinositol phospholipase C. *Biochem.* 248:791-799.
- 101.- Bojaninic, D., Wallace, M.A., Wojcikiewicz, R.J.H. y Fain, J.N. (1987) Guanine nucleotide and pyrophosphate activate exogenous phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate hydrolysis in rat liver plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 1088-1094.
- 102.- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K. O. y Sternwies, P. C. (1991) Regulation of polyphosphoinositide specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251: 804-807.
- 103.- Simon, M.I., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808.
- 104.- Boeynaems, J.M., Piroton, S., Van Coevorden, A., Raspe, E., Demolle, D. y Erneaux, C. (1988) P2-purinergic receptors in vascular endothelial cells: from concept to reality. *J. Recept. Res.* 8: 121-132.
- 105.- Rapiejko, P. J., Northup, J.K., Evans, T., Brown, J.E. y Malbon, C.C. (1986) G-proteins of fat cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5 Trisphosphate. *Biochem. J.* 240: 35-40.
- 106.- Pobier, B.F., Hewlett, E.L. y Garrison, J.C. (1985) Role of Ni in coupling angiotensin receptors to inhibition of adenylate cyclase in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 260: 16200-16209.

- 107.- Bruns, C. y Marme, D. (1987) Pertussis toxin inhibits the angiotensin II and serotonin induced rise of free cytoplasmic calcium in cultured smooth muscle cells from rat aorta. *FEBS Lett.* 212: 40-44.
- 108.- Shayman, J.A., Morrison, J.J. y Morrison, A.R. (1987) Islet activatin protein inhibits kinin stimulated inositol phosphate production, calcium mobilization and prostaglandin E2 synthesis in renal papillary collectin tubule cells independent of cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 262: 17083-17087.
- 109.- Roche, S., Bali, J. P., y Magous, R. (1990) Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the action of gastrin on gastric parietal cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1055: 287-294.
- 110.-Feister, A.J., Browder, B., Willis, H.E., Mohanakumar, T. y Ruddy, S. (1988) Pertussis toxin inhibits human neutrophil responses mediated by the 42 kilodaltons IgG Fa receptor. *J. Immunol.* 141: 228-233.
- 111.- Schimmel, R.J. y Elliott, M.E. (1986) Pertussis toxin does not prevent alpha adrenergic stimulated breakdown of phosphoinositides or respiration in brown adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 823-829.
- 112.- Fischer, J.B. y Schonbrunn, A. (1988) The bombesin receptor is coupled to a guanine nucleotide binding protein which is insensitive to pertussis and cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 263:2808-2816.
- 113.- Lynch, C.J., Prpic, V., Blackmore, P.F. y Exton, J.H. (1986) Effect of islet activating pertussis toxin on the binding characteristics of Ca²⁺ mobilizing hormones and on agonist activation on phosphorylase in hepatocytes. *Mol. Pharmacol.* 29: 196-203.
- 114.- Brass, L.F., Shaller, C.C. y Belmonte, E.J. (1987) Inositol, 1,4,5 trisphosphate induced granule secretion in platelets. *J. Clin. Invest.* 79: 1269-1275.
- 115.- Saito, H., Okajima, F., Moiski, T.F.P., Sha'afi, R.I., Ui, M. y Ishizaka T. (1987) Effects of ADP-ribosylation of GTP-binding protein by pertussis toxin on immunoglobulin E dependent and independent histamine release from mast cells and basophils. *J. Immunol.* 138:3927-3934.
- 116.- Rhee, S.G. (1991). Inositol phospholipids specific phospholipase C: Interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *Trends Biochem, Sci* 16: 297-301.
- 117.- Volpe, P., Krause, K.H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J. Lew, D.P. (1988) "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5 trisphosphate sensitive Ca²⁺ store of non muscle cells? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 35: 1091-1095.
- 118.- Leijten, P.A. y van Breemen C. (1984) The effects of caffeine on the noradrenaline sensitive calcium store in rabbit J. *Physol.* 357: 327-339.
- 119.- Pozzan, T., Volpe, P., Zorzato, F., Baravin, M., Krause, K.H., Meldolesi, J. y Lew, D.P. (1988) The Ins (1,4,5) P3 sensitive Ca²⁺ store of non muscle cells endoplasmic reticulum or calciosomes. *J. Exp. Biol.* 139: 181-93.

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

- 120.- García-Sáinz, J. A. y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1985) Stimulation of hepatic glycogenolysis by 12-*o*-tetradecanoli-phorbol-13-acetate (TPA) via cycloxygenase products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 6727-6730.
- 121.- Chan, T.H. , Blackmore, P.F. , Steiner, K.E. y Exton, J. (1979) Effects of adrenalectomy on hormone action on hepatic glucose metabolism reciprocal change in alpha and beta adrenergic activation of hepatic glycogen phosphorylase and calcium mobilization in adrenalectomized rats. *J. Biol. Chem.* **254**: 2428-2433.
- 122.- García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Olivares-Reyes, A. y Macías-Silva, M. (1992) Guinea pig hepatocyte alpha 1A-adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. of Pharmacol.* **227**:239-245.
- 123.- De Witt, L.M. y Putney, J.W. Jr. (1983) Stimulation of glycogenolysis in hepatocytes by angiotensin II may involve both calcium release and calcium influx. *FEBS Lett.* **160**: 259.
- 124.- Berridge, M.J. e Irvine, R.F. (1984) Inositol triphosphate a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**:315-321.
- 125.- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-308.
- 126.- Nishizuka, Y. (1983) Tumor promoter dependent mouse leukemia cell line. *Cancer Research* **43**(10): 4676-4680.
- 127.- Corvera, S. y García-Sáinz, J.A. (1984) Phorbol esters inhibit alpha-1 adrenergic stimulates of glucogenolysis in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **119**: 1128-1133 .
- 128.- Burch, R.M., Luini, A. y Axelrod, J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 7201-7205.
- 129.- García-Sáinz, J. A. , Romero-Avila, M.T., Alcántara, R., Macías-Silva, Olivares-Reyes, A. y González- Espinosa, C. (1992) Species heterogeneity of hepatic alpha 1-adrenoceptors: Alpha 1A, alpha 1B and alpha 1C subtypes. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **186**:760-767.
- 130.- Sulakhe, S.J., Pulga, V.B. y Tran, S. (1988) Hepatic alpha 1 and beta adrenergic receptors in various animal species. *Mol. Cell. Biochem.* **83**:81-88.
- 131.- Brown, B.L., Albano, J.D., Ekins, R.P., Sgherzi, A.M. y Tampion, W. (1971) A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3'5 - cyclic monophosphate. *Biochem. J.* **121**: 561-562.
- 132.- Mante, Saakwa, y Minneman, K.P. (1991) The alkylating prazosin analog SZL 49 inactivates both α_1A and α_1B -adrenoceptors. **208**: 113-117.
- 133.- Nomura, T., Kondo, H., Hasegawa, S., Watanabe, T., Yokoyama, R., Ukai, K., Tachibana, M., Sumi-Ichinose, Ch., Nomura, H., Hagino, Y. (1993) α_1B -Adrenoceptor-mediated stimulation of Ca₂++ mobilization and cAMP accumulation in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **246**: 113-120.

-
- 134.- Ren, Q., Kurose, H., Lefkowitz, R.J. y Cotecchia, S. (1993) Constitutively active mutants of the alpha2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 16483-16487..