

00562
N=1
2Ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

Caracterización del Receptor Alfa 1-
Adrenérgico en Hepatocitos del Pez Gato
Ictalurus punctatus

T E S I S
Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(B I O Q U I M I C A)
p r e s e n t a
Biol. Jesús Alberto Olivares Reyes



México, D. F.

ESTADO CON
SELA DE ORIGEN

1994

ESTADO CON
SELA DE ORIGEN



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 fue realizada en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz y la coasesoría del DR. Rafael Villalobos-Molina. Proyecto apoyado por CONACyT (03010-N9107) y DGAPA (IN 200193).

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

PRESIDENTE: Dra. Marietta Tuena de Gómez Puyou

VOCAL: Dra. Rosario Muñoz Clares

SECRETARIO: Dra. Irma Bernal Lugo

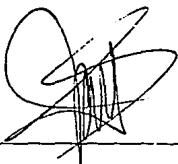
PRIMER SUPLENTE: Dr. Rolando Hernández Muñoz

SEGUNDO SUPLENTE: Dra. Marcia Hiriart

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Instituto de Fisiología Celular. UNAM

ASESOR DEL TEMA:



Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz

SUSTENTANTE:



Biol. Jesús Alberto Olivares Reyes

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz mi más sincero agradecimiento por brindarme su confianza, su apoyo y su acertada dirección en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Marina Macías Silva a quien le agradezco su amistad y el haberme apoyado en las diferentes facetas de este trabajo.

Al Dr. Rafael Villalobos Molina por su apoyo y motivación para la realización de este trabajo.

A las autoridades de la Coordinación de Pesca del Estado de México en especial al Dr. Ignacio Pagaza Garza, al TPA Alejandro Lili Muñoz, al Biol. Zeferino Camacho y a todo el personal del Centro Acuícola "La Paz" por su invaluable asesoramiento técnico y por el mantenimiento de los peces.

A los Drs. Rosario Muñoz Clares, Marietta Tuena de Gómez Puyou, Rafael Villalobos Molina y J. Adolfo García-Sáinz por sus sugerencias en los exámenes tutoriales.

A los Drs. Jesús Adolfo García-Sáinz, Rosario Muñoz Clares, Marietta Tuena de Gómez Puyou, Marcia Hiriart, Irma Bernal Lugo y Rolando Hernández Muñoz por la revisión crítica y acertados comentarios de este trabajo.

A mis compañeros: Marina Macías, Gloria Gutiérrez, Rocio Alcántara, Claudia González, Tere Romero, Marta Robles, Patricia Casas, Artemio Mendoza, Agustín García y Gonzalo Allende a quienes les agradezco con sinceridad su amistad.

A la DGAPA por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría.

**Dedico esta tesis con mucho amor y respeto a las personas que con cada instante de su tiempo, de su cariño y de su comprensión durante todas las facetas de mi existencia me han motivado para seguir adelante y lograr cada una de la metas propuestas:
mis Padres Agustín y Graciela**

A mi hermana Alejandra con todo mi cariño por todos esos momentos de alegría que compartimos.

A todos mis tíos y a mi abuelo Pablo Reyes a quienes les agradezco por brindarme todo su apoyo y confianza.

A Judith que se ha convertido en uno de los motivos más hermosos y por quien deseo seguir adelante compartiendo éste y todos los momentos importantes de mi vida, siempre a su lado.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	18
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS.....	22
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFIA.....	33

RESUMEN

La caracterización de los receptores α_1 -adrenérgicos en hígado de diferentes especies de mamíferos muestra una considerable variación en cuanto a los subtipos que se expresan: en rata, ratón y hamster, el α_{1B} ; en conejo, el α_{1C} , y en cuyo el α_{1A} . En aves, el receptor que se expresa es el α_{1B} . Sin embargo, en vertebrados menores (peces, anfibios y reptiles) aún no se ha demostrado su existencia. Para ello en el presente trabajo se propuso la caracterización farmacológica de la respuesta α_1 -adrenérgica en hepatocitos del pez gato, *Ictalurus punctatus*, en donde la norepinefrina, en presencia de propranolol, que bloquea la acción β -adrenérgica, incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} de una manera dependiente de la dosis. Este efecto fue inhibido por antagonistas α_1 con el siguiente orden de potencia: WB4101 > benoxatian \geq 5-metil urapidil > fentolamina > (+)niguldipina. El pretratamiento con el antagonista irreversible, cloroetilclonidina, el cual permite distinguir entre los diferentes subtipos de receptores α_1 , reduce la magnitud de la respuesta. La estimulación con norepinefrina, también incrementa la resíntesis de fosfatidilinositol, de una manera dependiente de la dosis. Por otra parte, estudios de fijación del ligando radioactivo [^{125}I]HEAT en membranas hepáticas aisladas por gradiente de sacarosa, demostraron la existencia de un número pequeño de receptores α_1 -adrenérgicos (33 fmol/mg de proteína) de alta afinidad ($K_D=100$ pM). Experimentos de competencia, utilizando la misma técnica, mostraron el siguiente orden de potencia: 1) Para agonistas: oximetazolina > epinefrina \geq norepinefrina > metoxamina. 2) Para antagonistas: prazosina > WB4101 > benoxatian \geq 5-metil urapidil > fentolamina > (+)niguldipina. El efecto de cloroetilclonidina redujo de manera importante la fijación del [^{125}I]HEAT. Estos resultados sugieren que el subtipo de receptor α_1 -adrenérgico presente en células hepáticas del pez gato *Ictalurus punctatus*, es similar al α_{1B} , y que éste, además, modula respuestas fisiológicas como el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular.

INTRODUCCION

La epinefrina y la norepinefrina tienen una participación muy importante en la regulación de la homeostasis de una amplia variedad de funciones fisiológicas. El estudio de las acciones adrenérgicas se inicia en el año de 1895 cuando Oliver y Shafer, al trabajar con extractos de médula adrenal de mamífero, observaron que éstos provocaban vasoconstricción y elevación de la presión sanguínea al inyectarlo en la circulación. John Able identificó y purificó al compuesto activo responsable de estos efectos denominándolo adrenalina (epinefrina) y posteriormente, Stolz y Dakin de forma independiente determinaron su composición química lográndola sintetizar (Hoffmann & Lefkowitz, 1991). Cerca de 100 años después de estos hallazgos se han realizado un gran número de trabajos para determinar con detalle sus efectos y los mecanismos de acción sobre los diferentes sistemas celulares en los que ejercen sus efectos.

La epinefrina, conocida como la hormona de las grandes emergencias, se sintetiza y se almacena en la médula adrenal de donde se libera al torrente sanguíneo, por el que llega a diferentes tejidos. En mamíferos, regula funciones vitales como el aumento de la presión sanguínea y la regulación de la frecuencia cardiaca, la activación de la glucogenólisis en hígado, la regulación de la contracción del músculo liso y el control de la secreción hormonal de las glándulas endócrinas y exócrinas, entre otras muchas funciones. Además, la epinefrina también actúa como un neurotransmisor en ciertas regiones del sistema nervioso central (Hoffmann & Lefkowitz, 1991).

Por su parte, la norepinefrina, un precursor de la epinefrina, ejerce sus acciones como neurotransmisor periférico y central; se sintetiza y se almacena en las terminaciones neuronales del sistema nervioso simpático y se libera en tejidos inervados, ejerciendo efectos fisiológicos locales. Como hormona se libera por la glándula suprarrenal y estimula la contracción del corazón, dilata los bronquios y aumenta la fuerza contráctil de los músculos (Hoffmann & Lefkowitz, 1991).

La síntesis de estas dos catecolaminas se realiza a partir del aminoácido tirosina, a través de una serie de pasos enzimáticos que culminan con la formación de la epinefrina (figura 1).

Para poder desempeñar sus efectos en los diferentes tejidos, estas catecolaminas se unen a receptores protéicos específicos, localizados en la superficie celular (receptores adrenérgicos) los cuales son miembros de una gran y diversa familia de proteínas integrales de membrana, que ejercen sus acción a través de su acoplamiento con una proteína que requiere de nucleótidos de guanina (proteína G).

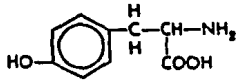
A continuación se hará una breve revisión sobre las características generales de estos receptores.

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINAS G

Los receptores acoplados a proteínas G son importantes reguladores fisiológicos ya que constituyen el blanco de una gran variedad de hormonas y neurotransmisores, así como para factores autócrinos y parácrinos. Aunque los miembros de esta superfamilia unen varios tipos de ligandos y median una amplia variedad de respuestas, la estructura primaria de estas proteínas es notablemente similar. Una de sus características más importantes es la presencia de siete dominios hidrofóbicos transmembranales. La topografía para este modelo predice que los dominios se encuentran conectados entre sí por tres asas extracelulares y tres intracelulares, y que la región amino y carboxilo terminal se localizan en el espacio extracelular e intracelular, respectivamente (Dohlman, *et al.*, 1987a; Lefkowitz & Caron, 1988; Baldwin, 1994).

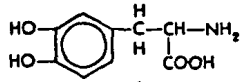
Los estudios sobre las características topográficas de estos receptores se basa en el modelo determinado para la bacteriorrodopsina, proteína de membrana aislada de *Halobacterium halobium* y para el pigmento fotorreceptor de vertebrados, rodopsina, en donde estudios por difracción de electrones y microscopía electrónica han determinado la presencia de siete dominios transmembranales

TIROSINA



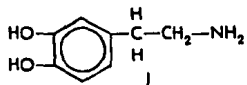
Hidroxilasa de la Tirosina

DIHIDROXIFENILALANINA (L-DOPA)



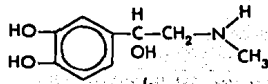
Descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos

DOPAMINA



β -Hidroxilasa de la Dopamina

NOREPINEFRINA



N-Metiltransferasa de la Feniletanolamina

EPINEFRINA

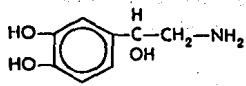


Figura 1. Biosíntesis de Catecolaminas.

(Henderson & Unwin, 1975, Dohlman, *et al.*, 1987a).

Las evidencias que existen de esta misma topografía para los receptores adrenérgicos se pudo determinar gracias a estudios bioquímicos, utilizando proteólisis limitada (Dohlman, *et al.*, 1987b) y a estudios inmunológicos, realizados con el receptor β_2 -adrenérgico (Wang, *et al.*, 1989).

El objetivo de muchas investigaciones se ha centrado en determinar los mecanismos moleculares por los que los receptores adrenérgicos y otros acoplados a proteínas G, ejercen específicas y variadas respuestas celulares por la unión de sus ligandos naturales. El estudio de la secuencia de estas proteínas receptoras no únicamente ha proporcionado información acerca de la estructura, sino, además, ha permitido su manipulación genética, realizando cambios en la secuencia de nucleótidos. Estas mutaciones dirigidas ampliaron el conocimiento acerca de los dominios estructurales que están involucrados en la unión del ligando y en la interacción con la proteína G (Lomasney, *et al.* 1991a; Baldwin, 1994) .

Uno de los receptores acoplados a proteínas G más estudiados es el β -adrenérgico, sirviendo como modelo para el estudio de todos los receptores adrenérgicos (Shorr, *et al.*, 1981; Shorr, *et al.*, 1982; Dixon, *et al.*, 1987; Strader, *et al.*, 1988).

Hasta hace sólo algunos años, la caracterización de los receptores acoplados a proteínas G se apoyaba en un carácter puramente farmacológico, basado en las afinidades de agonistas y antagonistas. Sin embargo, en la actualidad se utilizan tres enfoques para su identificación. Históricamente, el más usado es el estudio funcional de una respuesta fisiológica tanto en animales (*in vivo*) como en tejidos aislados (*in vitro*). El rápido desarrollo de la técnica de fijación de ligandos radioactivos (binding) ha constituido en orden cronológico la segunda de las herramientas más utilizadas para una identificación farmacológica. Por último, el reciente desarrollo de las técnicas de biología molecular permite la identificación de receptores por clonación. Con estas metodologías se ha logrado localizar anatómicamente los diferentes receptores para una hormona particular, identificar

si la respuesta funcional es de tipo excitatorio o inhibitorio e identificar el sistema transduccional al que se acoplan. De estos estudios se encontró que un gran número de hormonas y neurotransmisores poseen más de un receptor al cual pueden unirse, activando un sistema transduccional específico. Uno de los ejemplos más representativos es el de las catecolaminas endógenas epinefrina y norepinefrina, las cuales pueden unirse a tres tipos de receptores: los α_1 , acoplados estimulatoriamente al recambio de fosfoinosítidos; los α_2 , que inhiben la actividad de la adenilato ciclasa y los β -adrenérgicos acoplados estimulatoriamente a la adenilato ciclasa. De estos tipos de receptores se han descrito al menos cuatro subtipos para los α_1 (A-D) y α_2 (A-D), y tres para los β (1-3) (figura 2) (Bylund, 1992; Lomasney, *et al.*, 1991a; Summers & McMartin, 1993). Otros casos similares están reportados para la angiotensina II, la histamina, la serotonina, el GABA, la acetilcolina y el glutamato, entre otros (para una revisión sobre la clasificación de estos receptores ver Keibian & Neumeyer, 1994). Pero, ¿cuál es el significado real de la gran variedad de receptores que pueden existir para una sola hormona?. La pregunta permanece sin ser resuelta, pero presumiblemente, esta variedad permita un grado perfecto de especificidad y de control de los procesos bioquímicos y fisiológicos en el organismo.

Un aspecto muy interesante e importante es el hecho de que todos estos estudios han permitido identificar diferencias a nivel estructural y funcional entre los tipos y subtipos de receptores para una hormona: 1) diferencias en cuanto a su estructura primaria, lo que les confieren distintas afinidades para la hormona o neurotransmisor natural; 2) diferencias en la afinidad para drogas sintéticas, agonistas o antagonistas; 3) diferencias en su localización tisular; 4) diferente mecanismo de transducción de señales, en algunos casos; y, 5) diferencias en la regulación de la densidad de los receptores (esto en función del estado fisiológico, patológico o del desarrollo).

A continuación se hará una revisión sobre los receptores adrenérgicos, con especial interés en el tipo α_1 , dada su importancia para el presente trabajo de tesis.

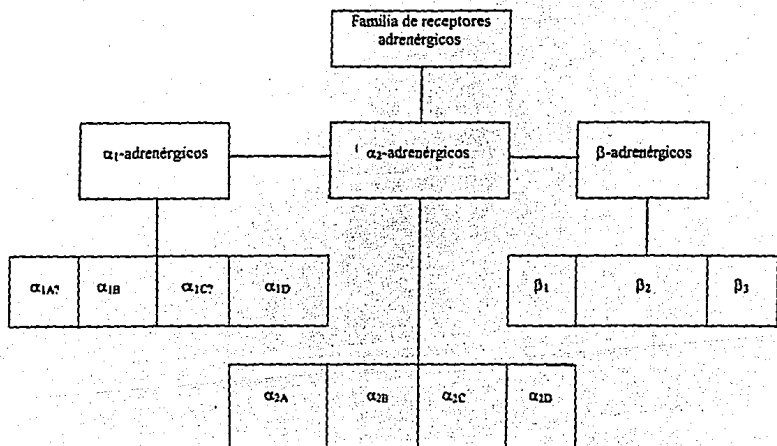


Figura 2.
Clasificación de los receptores adrenérgicos

RECEPTORES ADRENERGICOS

Históricamente, los receptores adrenérgicos fueron divididos en dos por Ahlquist en el año de 1948: los receptores α - y los β -adrenérgicos. La existencia de los subtipos de receptores β_1 y β_2 fue reconocida por primera vez en 1967 y dos diferentes tipos de receptores α (α_1 y α_2) fueron descubiertos en los años setenta. En la década de los ochenta, el desarrollo de drogas más selectivas y el uso de la tecnología de clonación molecular permitió, sorprendentemente, identificar nuevos subtipos de receptores adrenérgicos (Minneman y Esbenshade, 1994).

Actualmente se reconocen tres principales familias (α_1 , α_2 y β) y cada una contiene distintos subtipos de receptores (figura 2). Estas familias son subdivididas de acuerdo a la homología de sus secuencias primarias, su especificidad por distintas drogas y a los mecanismos de transducción de señales al que se acoplan.

Las familias se caracterizan por que existe entre ellas cerca de un 40% de homología en sus secuencias y de un 70 a un 75% de homología entre los subtipos que las constituyen (Lefkowitz y Caron, 1988; Lomasney *et al*, 1991a); cuentan con un perfil farmacológico característico, aunque la especificidad por las diferentes drogas difiere entre los subtipos y por que activan al mismo, o similar, mecanismo de transducción de señales. Cada subtipo es producto de un gene separado y presenta una especificidad farmacológica y distribución tisular particular.

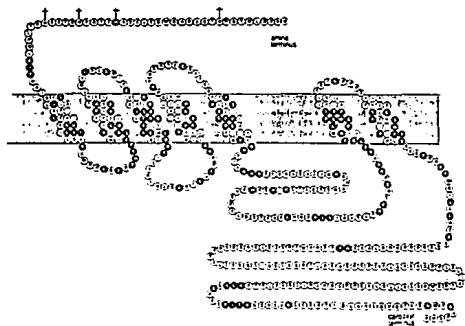
RECEPTORES α , ADRENERGICOS

Los receptores α , han sido caracterizados por innumerables estudios farmacológicos, funcionales y de biología molecular, los cuales han sugerido la existencia de quizá cuatro subtipos de receptores (α_{1A} , α_{1B} , α_{1C} y α_{1D}) tres de los cuales han sido aislados por clonación molecular (α_{1B} , α_{1C} y α_{1D}) (Minneman & Esbenshade, 1994).

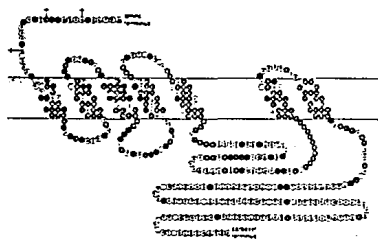
Al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, los α_1 -adrenérgicos están constituidos por una sola cadena de aminoácidos que atraviesa siete veces la membrana plasmática formándose, por este mismo hecho, tres asas intracelulares y tres extracelulares (Lomasney, *et al.*, 1994) (figura 3). Los estudios de biología molecular han proporcionado datos acerca de la longitud aproximada de estos receptores adrenérgicos, los cuales presentan entre 466 y 560 residuos de aminoácidos. De su estructura primaria, el peso molecular calculado para estos receptores se encuentra entre 37000 y 45000 M_r (Lomasney, *et al.*, 1991a).

En cuanto a sus características farmacológicas, estos receptores presentan la misma afinidad por sus agonistas naturales (epinefrina y norepinefrina). Todos los receptores α_1 son bloqueados por el antagonista prazosina (compuesto considerado como un bloqueador no selectivo para los α_1 -adrenérgico) y demuestran baja afinidad por los antagonistas α_2 -adrenérgicos, yohimbina y rauwolfsina.

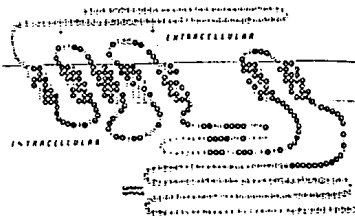
El desarrollo de la técnica de fijación de ligandos radioactivos (binding) constituye uno de los avances más importantes para el estudio farmacológico de los receptores α_1 -adrenérgicos. En los estudios iniciales de estos receptores, durante la década de los años setenta, se utilizaron la ³H-DHE (dihidroergocriptina) y el [³H]WB4101 (2-[(2',6'-dimetoxi)fenoxietil-amino]metilbenzodioxan). Estos dos ligandos fueron utilizados antes de la distinción de los receptores α_1 - y α_2 -adrenérgicos y ambos, posteriormente, demostraron tener selectividad no solamente por el receptor α_1 -adrenérgico sino por otros receptores resultando inadecuada su utilización. Posteriormente, se sintetizaron dos nuevos antagonistas radioactivos que mostraron una mucho mayor afinidad por los α_1 ; estos fueron la [³H]prazosina y el [¹²⁵I]-BE 2254 (I-HEAT) (figura 4). La prazosina presenta todas las características de un excelente ligando para los receptores α_1 -adrenérgicos. Entre sus propiedades más notables se encuentran su alta afinidad por estos receptores, un grado mínimo de asociación no específica y sitios de asociación de una sola clase (Bylund, 1987). El [¹²⁵I]-HEAT, por su parte, fue utilizado por vez primera para identificar sitios α_1 -adrenérgicos en corteza cerebral de rata. De manera similar a la prazosina, este compuesto se une con alta afinidad y buena



Receptor α_{1B} -adrenérgico



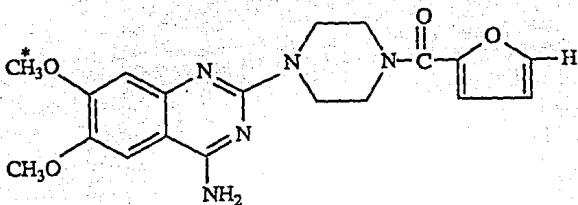
Receptor α_{1C} -adrenérgico



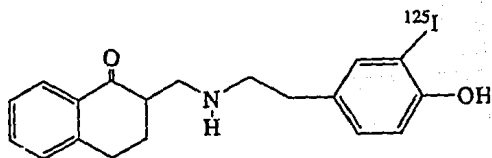
Receptor α_{1D} -adrenérgico

Figura 3.

Modelo estructural de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos.
 (Tomados de Schwinn, *et al.*, 1990; Lomasney, *et al.*, 1991a, y Lomasney, *et al.*, 1991b)



[³H]-PRAZOSINA



[¹²⁵I]-HEAT 6 [¹²⁵I]-BE2254

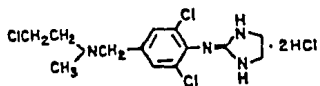
Figura 4.
Estructura química de los radioligandos [³H]-Prazosina y [¹²⁵I]-HEAT

selectividad a los receptores α_1 -adrenérgicos. Tiene la ventaja de que su actividad específica (2200 Ci/mmol) es, aproximadamente, 30 veces mayor que la de la [^3H]prazosina. Así, es utilizado particularmente en los casos en que la cantidad de tejido es limitada o la cantidad de sitios receptores es muy pequeño (Bylund, 1987).

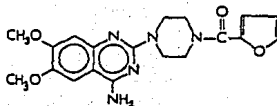
Una de las particularidades de estos compuestos es que no distinguen entre los subtipos α_1 -adrenérgicos. Esto, aunado a la síntesis de una gran cantidad de antagonistas (figura 5) y agonistas (figura 6) selectivos, ha permitido la identificación de los diferentes subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, los cuales presentan un perfil farmacológico característico basado en el orden de potencia demostrado por estos compuestos (Bylund, 1987; Summers & McMartin, 1993; Bylund, *et al.*, 1994).

I. Estudios Farmacológicos

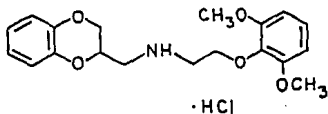
A mediados de los años ochenta, surgieron evidencias de la existencia de al menos dos tipos distintos de receptores α_1 adrenérgicos en base a características farmacológicas. Morrow y Creese (1986) demostraron dos poblaciones distintas de receptores α_1 en sistema nervioso central de rata con diferentes afinidades para los antagonistas fentolamina y WB 4101 (fig. 5). Los sitios con alta afinidad para el WB4101 y fentolamina fueron designados como α_{1A} y los de baja afinidad para los mismos compuestos como α_{1B} . Otros estudios mostraron que el antagonista irreversible cloretilclonidina (fig. 5) inactiva únicamente a la mitad de los sitios presentes en membranas de corteza cerebral de rata (Johnson & Minneman, 1987; Han *et al.*, 1987a). El estudio con estos compuestos, en distintos tejidos, mostró la existencia de al menos dos sitios receptores α_1 -adrenérgicos: unos fueron completa y potentemente inhibidos por la CEC (sensibles a CEC) mientras que los otros sitios fueron insensibles al mismo compuesto (Han *et al.*, 1987a). Posteriormente, se demostró que tanto la cloroetilclonidina como el WB 4101 distinguen la misma subpoblación de sitios adrenérgicos (Minneman, *et al.*, 1988); los que tienen alta afinidad para el antagonista competitivo WB 4101 (α_{1A}) correlacionaron con los sitios insensibles a CEC, mientras que los sitios de unión con una baja afinidad para el WB 4101 (α_{1B}) lo hicieron con los sitios sensibles a CEC. Estudios de tipo



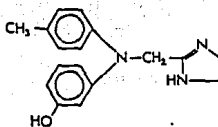
Cloroetilclonidina (CEC)



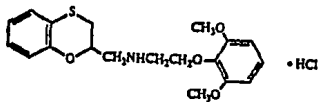
Prazosina



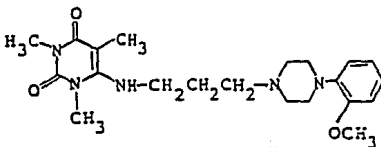
WB 4101



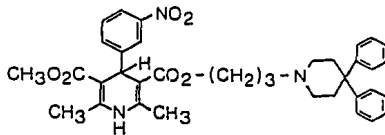
Fentolamina



Benoxatán

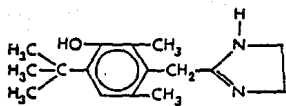


5-metil urapidil

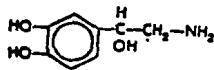


(+)Niguldipina.

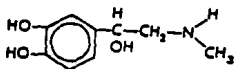
Figura 5.
Estructura química de antagonistas α_1 -adrenérgicos.



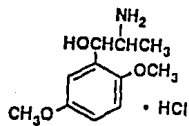
Oximetazolina



Norepinefrina



Epinefrina



Metoxamina

Figura 6.
Estructura química de agonistas α_1 -adrenérgicos.

funcional sobre la contracción de músculo liso aislado, presentaron una correlación similar entre la baja afinidad para el WB 4101 y una alta sensibilidad para la inactivación por CEC.

Actualmente, se acepta la existencia de estos dos subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos, que se ha confirmado por la utilización de otras drogas mucho más selectivas. Así, se demostró que el antagonista competitivo 5-metil urapidil (fig. 5) se une preferencialmente a sitios α_1 con alta afinidad por el WB 4101, considerándose como un ligando α_{1A} . Este compuesto presenta, aproximadamente, 70 veces más selectividad por el subtipo α_{1A} que el que presenta WB 4101 y de 20 a 30 veces más que fentolamina (Gross, *et al.*, 1988; Hanft & Gross, 1989). De igual forma, otros compuestos como la (+)niguldipina (fig. 5) (Boer, *et al.* 1989) y el benoxatán (fig. 5) (Han, *et al.*, 1987a; Han, *et al.*, 1987b) presentan una mayor afinidad por el subtipo de receptor α_{1A} que por el subtipo α_{1B} -adrenérgico. Sin embargo, antagonistas competitivos que presenten una alta afinidad por el subtipo α_{1B} -adrenérgico no han sido desarrollados, reconociéndose principalmente por su alta sensibilidad a la CEC.

Por lo que respecta a los agonistas utilizados para diferenciar entre estos subtipos de receptores adrenérgicos, se ha demostrado que la metoxamina (fig. 6) presenta una mucho mayor afinidad por el receptor α_{1A} que por el subtipo α_{1B} -adrenérgico (García-Sáinz, *et al.*, 1985; Tsujimoto, *et al.*, 1989; García-Sáinz, *et al.*, 1993). La oximetazolina (fig. 6) también demuestra selectividad por el subtipo α_{1A} (García-Sáinz, *et al.*, 1985; Han, *et al.*, 1987a) aunque estudios recientes dan evidencia de una mayor selectividad por el receptor α_{1C} (García-Sáinz, *et al.*, 1993).

II. Estudios de Biología Molecular

Los estudios de clonación molecular han permitido el aislamiento de tres clonas de cDNA de receptores α_1 -adrenérgicos. Sin embargo, la relación de estas clonas con el subtipo α_{1A} -adrenérgico caracterizado farmacológicamente, es aún controversial.

Ila) Receptor α_{1B} -adrenérgico

La primera clona de cDNA de receptores α_1 -adrenérgicos fue aislada de una biblioteca genómica de la línea celular DDT₁-MF-2 de músculo liso de hamster (Cotecchia, *et al.* 1988). Esta clona codificó para una proteína de 515 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 56 KDa., que difería al reportado con anterioridad por Lomasney y colaboradores de aproximadamente 80KDa (Lomasney, *et al.*, 1986). La principal diferencia entre los pesos moleculares reportados se debe a modificaciones postransduccionales que sufre el receptor. Estas modificaciones consisten en la adición de oligosacáridos a residuos de asparagina en el extremo amino terminal (Sawutz, *et al.*, 1987; Lefkowitz & Caron, 1988; Lomasney, *et al.*, 1991a).

De la estructura primaria se obtuvieron datos importantes sobre la regulación del receptor, como la existencia de sitios potenciales de ser fosforilados por la proteína cinasa C (varias treoninas y serinas presentes en la segunda y tercera asa citoplasmática). Además, la tercera asa intracelular presenta una región consenso de reconocimiento para la proteína cinasa A (residuos 230-234) conservada en la misma posición del receptor α_{2A} -adrenérgico (Cotecchia, *et al.* 1988). Estudios realizados *in vitro*, utilizando preparaciones de receptores α_1 -adrenérgicos, proteína cinasa C purificada de cerebro y la subunidad catalítica de la proteína cinasa A, han demostrado que ambas cinasas pueden fosforilar al receptor (Leeb-Lundberg, *et al.*, 1987; Bouvier, *et al.*, 1987). Sin embargo, la ocupación del receptor por agonistas incrementa la velocidad de fosforilación únicamente por la proteína cinasa C, sin ser identificados los residuos específicos de serina y treonina que son fosforilados por esta cinasa (Bouvier, *et al.*, 1987; García-Sáinz, 1993). Por otra parte, aún se desconoce el papel fisiológico de la fosforilación del receptor α_1 -adrenérgico por la proteína cinasa A.

La expresión de esta clona en células COS-7 resultó en un receptor con características farmacológicas similares al subtipo α_{1B} -adrenérgico (Cotecchia, *et al.* 1988) que estimula la formación de fosfatos de inositol cuando es activado. El análisis por la técnica de Northern blot demostraron que el mRNA para esta clona presenta una distribución tisular similar a la reportada para el subtipo

α_{1B} -adrenérgico. Estudios de hibridación en células somáticas de humano demostraron la existencia de un gene localizado en el cromosoma 5 que codifica para una proteína similar al receptor α_{1B} -adrenérgico de hamster.

Actualmente, las investigaciones realizadas en tejidos de diversas especies de mamíferos han permitido la identificación de este subtipo de receptor adrenérgico: a) en hígado de rata (Lomasney, *et al.*, 1991b; García-Sáinz, *et al.*, 1992a; García-Sáinz, *et al.*, 1994), ratón y hamster (García-Sáinz, *et al.*, 1994); b) en tejido graso (Torres-Marquez, *et al.*, 1992), corazón, corteza cerebral, tallo cerebral, riñón, pulmón y bazo de rata (Lomasney, *et al.*, 1991b; Ramarao, *et al.*, 1992), y c) en bazo, riñón, cerebelo y cerebro fetal de humano, principalmente (Price, *et al.*, 1994).

IIb) Receptor α_{1C} -adrenérgico

Un cDNA adicional, que codifica para un polipéptido de 466 residuos de aminoácidos, se aisló de una biblioteca genómica de cerebro de bovino (Schwinn, *et al.*, 1990). Esta clona tuvo una homología del 72%, en la región transmembranal con la clona de hamster (α_{1B}), lo que sugirió que el cDNA de bovino correspondía a un receptor α_1 -adrenérgico. Además, su alta afinidad por el antagonista α_1 -adrenérgico [125 I]HEAT y su característico perfil farmacológico por diversos agonistas y antagonistas α_1 , confirmó que este cDNA codificaba para un receptor α_1 -adrenérgico. Sin embargo, un estudio de hibridación somática del cDNA de bovino, con células de humano, identificó en el cromosoma 8 un gene que codifica para un receptor similar (Schwinn, *et al.*, 1990), que es distinto al identificado en el cromosoma 5 que codifica para un receptor α_{1B} -adrenérgico (Yang-Feng, *et al.*, 1990). Además, la transfección del cDNA en células COS7 resultó en un subtipo con una alta afinidad por agentes α_{1A} -adrenérgicos, pero con la característica farmacológica de ser sensible a CEC. Este nuevo subtipo fue designado como α_{1C} (Schwinn, *et al.*, 1990). Al igual que el subtipo α_{1B} , este receptor contiene una región conservada para la fosforilación por la proteína cinasa A en la tercera asa intracelular, además de la presencia de varias treoninas y serinas en la segunda y tercera asas citoplásmicas, que son sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa C (Schwinn, *et al.*, 1990; Lomasney, *et al.*,

1991a). Su mRNA se ha detectado en cantidades significativas en diversos tejidos de humano: hipocampo (Schwinn, *et al.*, 1990), hígado, corazón, cerebelo y corteza cerebral, principalmente (Price, *et al.*, 1994). Por otra parte, por estudios de Northern blot utilizando una sonda de cDNA para este subtipo de receptor, se ha localizado en hígado de conejo, que además está de acuerdo con sus características farmacológicas (Schwinn, *et al.*, 1991; García-Sáinz, *et al.*, 1992; García-Sáinz, *et al.*, 1993). Un aspecto interesante es que este subtipo no había sido detectado, inicialmente, en ningún tejido de rata (corteza cerebral, pituitaria, hipocampo, hígado, corazón, pulmón, riñón, bazo, aorta, tejido adiposo, músculo esquelético, conductos deferentes) ni en hígado, corazón, riñón o pulmón de bovino (Schwinn, *et al.*, 1990). Sin embargo, evidencias recientes (Forray, *et al.*, 1994; Rokosh, *et al.*, 1994), sugieren que este receptor pudiera corresponder al α_{1A} clásico, ya que un parcial cDNA del receptor α_{1C} fue obtenido de miocitos de corazón de rata (Rokosh, *et al.*, 1994). La deducción de su secuencia de aminoácidos codificó para una proteína con un alto grado de identidad con la obtenida para el α_{1C} de bovino y de humano. El mRNA del receptor α_{1C} de rata fue detectado en tejidos que han sido identificados por expresar el subtipo α_{1A} farmacológico, sugiriéndose hasta este momento, que el subtipo α_{1C} clonado corresponde al subtipo α_{1A} -adrenérgico. Por otra parte, un estudio farmacológico también muestra que el subtipo α_{1C} presenta las propiedades farmacológicas del subtipo α_{1A} : alta afinidad por 5-metil urapidil, WB4101 y (+)niguldipina. En cuanto a su sensibilidad a CEC, al parecer ésta puede depender de pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos o de la especie en que se exprese el receptor (Forray, *et al.* 1994).

IIc) Receptor α_{1D} -adrenérgico

Un tercer subtipo de receptor α_1 -adrenérgico fue clonado de una biblioteca genómica de cDNA de corteza cerebral de rata (Lomasney, *et al.*, 1991b). Esta clona, que codificó para una proteína de 560 aminoácidos (y fue similar en un 73% a la clona α_{1B} de hamster en la región transmembranal), se identificó como la que codificaba para el subtipo α_{1A} . Esta designación se debió, principalmente, a que el mRNA de esta clona presentó una distribución tisular en rata similar a la identificada por estudios farmacológicos para el subtipo α_{1A} . Además, la expresión del receptor en células COS-7 presentó características farmacológicas similares a

las del subtipo α_{1A} , con una alta afinidad por los compuestos WB 4101 (antagonista), fenilefrina y metoxamina (agonistas) (Lomasney, *et al.*, 1991b). Sin embargo, el agonista oximetazolina que es conocido como un agonista selectivo α_{1A} , presentó muy baja afinidad por este subtipo de receptor y, en contraste a lo reportado para el subtipo α_{1A} , el receptor clonado demostró una parcial sensibilidad a CEC (Lomasney, *et al.*, 1991b).

Una clona esencialmente idéntica fue aislada, en el mismo periodo, por el grupo de Graham y colaboradores (Perez, *et al.*, 1991) de una biblioteca genómica de hipocampo de rata difiriendo, únicamente, por dos codones de la aislada por Lomasney y colaboradores. Estudios de las propiedades farmacológicas del receptor expresado por esta clona demostraron afinidades por los antagonistas (+)niguldipina y 5-metil urapidil cerca de cien veces menor que las reportadas para el subtipo α_{1A} , presentando, además, sensibilidad a CEC, característica similar al subtipo α_{1B} . El mRNA para este receptor fue localizado en bazo de rata, que por experimentos farmacológicos estaba caracterizado como un subtipo α_{1B} -adrenérgico. De esta forma, la clona aislada por Graham *et al.* codificaba para un nuevo subtipo de receptor α_1 -adrenérgico, que fue denominado α_{1D} . Una de las características de este nuevo receptor es la presencia de dos sitios potenciales de N-glicosilación en el extremo amino terminal (asparagina 60 y 76) y la presencia de varias serinas y treoninas en el extremo carboxilo terminal y en las asas intracelulares, que pueden servir de sitios potenciales de fosforilación por la proteína cinasa C (Perez, *et al.*, 1991). Un aspecto interesante, es que este receptor carece de una región consenso para la fosforilación por la proteína cinasa A, a diferencia de lo reportado para los subtipos α_{1B} y α_{1C} (Lomasney, *et al.*, 1991b). Estos datos sugieren que el mecanismo de regulación del receptor α_{1D} -adrenérgico es diferente al de los subtipos α_{1B} y α_{1C} . Schwinn & Lomasney, posteriormente, confirmaron la misma especificidad por las diferentes drogas para el receptor clonado por ellos y ambos grupos concordaron en que se trataba de la misma clona. La diferencia de codones entre estas dos clonas, al parecer, se debió a errores en la secuenciación o variaciones individuales menores, considerándose por sus características farmacológicas como un nuevo subtipo de receptor diferente al α_{1A} .

designándose como α_{1AD} o como α_{1D} -adrenérgico (Schwinn & Lomasney, 1992).

Un intento más por clonar el subtipo α_{1A} fue realizado por Bruno y colaboradores en 1991, al aislar una secuencia de cDNA de humano la cual designaron como α_{1A} , aunque probablemente se trate de un receptor α_{1AD} (Bruno, *et al.*, 1991). Este cDNA no ha sido expresado y aún se desconoce si codifica para un receptor funcional; además, aunque la región 5' terminal de los cDNAs que codifican para el receptor de rata y humano son del mismo largo y esencialmente idénticas para ambas especies, el marco de lectura abierto de la clona α_{1AD} de humano es cerca de 100 pb más corta que la clona de rata, que codifica para una secuencia de 30 aminoácidos diferentes. Así mismo, la identidad de secuencias entre estas clonas es relativamente baja para los 180 pb siguientes, después de la cual la identidad se vuelve alta. Por el momento la relación entre las clonas de rata y de humano permanece aún sin ser aclarada.

IIId) Receptor α_{1A} -adrenérgico

Por lo que respecta al subtipo α_{1A} , es clara su existencia por los estudios farmacológicos que así lo demuestran. Sin embargo, ningún cDNA que lo exprese se ha aislado a pesar de los intentos de un gran número de investigadores y de los diversos tejidos que presentan este receptor.

Por otra parte, la clona que codifica para el receptor α_{1D} presenta características farmacológicas diferentes a las del receptor α_{1A} , que podrían definirlo como un subtipo diferente, a pesar de que inicialmente una de las clonas fue definida como la que expresaba al subtipo α_{1A} . Como ya se mencionó con anterioridad, se propone que muy probablemente este subtipo corresponda al α_{1C} clonado.

Las modificaciones postransduccionales del receptor, el tipo celular en que expresa y se estudia y las condiciones en que se realizan los estudios farmacológicos y funcionales pueden ser determinantes en la especificidad por los diferentes agonistas y antagonistas, siendo una posible explicación para estos resultados controversiales observados. Además, la expresión de un cDNA en un

determinado tipo celular no necesariamente pudiera resultar en un receptor con propiedades farmacológicas idénticas al subtipo que se expresa en forma nativa en un tejido determinado.

III. Sistema de Transducción de los Receptores α_1 -Adrenérgicos

Los receptores α_1 -adrenérgicos son uno de los principales tipos de receptores de la superficie celular, que producen cambios en la actividad de la célula por el incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} (García-Sáinz y Fain, 1980). Para ello se acoplan estimulatoriamente a la fosfolipasa C a través de una proteína G_q , que inicia la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) para producir dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG), que activa a la proteína cinasa C (PKC) y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3), que actúa sobre un receptor intracelular específico que libera el Ca^{2+} almacenado en pozas, principalmente de retículo endoplasmático (Berridge, 1987) (figura 7). También se ha postulado que los adrenorreceptores α_1 se acoplan directamente a un flujo de Ca^{2+} extracelular a través de la activación de un canal sensible a dihidropiridinas (Han, *et al.*, 1987).

Todos los receptores α_1 -adrenérgicos están acoplados a su sistema efector a través de una proteína que requiere nucleótidos de guanina (proteína G_q) (Kobilka, 1992; Summers & McMartin, 1993). Esta familia de proteínas se hallan formadas por tres subunidades: la subunidad α (de 45 a 42 KDa), la β (de 35 a 37 KDa) y la γ (de 8 a 10 KDa). Las subunidades β y γ se hallan fuertemente asociadas una a otra de manera no covalente. La secuencia de aminoácidos para cuatro subunidades β de mamífero presentan entre un 83 y un 90% de identidad entre ellas (Neer, 1994). En relación a la subunidad γ , han sido identificadas al menos siete isoformas de mamífero y presentan un menor grado de identidad que la subunidad anterior (al rededor de un 38% entre ellas). Por su parte, la subunidad α contiene un sitio de unión para nucleótidos de guanina y posee actividad de GTPasa. Para el caso de los receptores α_1 -adrenérgicos, esta subunidad pertenece a la clase de las α_q (con cuatro miembros: α_q , α_{11} , α_{14} y α_{16}). En el estado no activo de las proteínas G_q , la subunidad α tiene unido GDP y se halla asociada al complejo β/γ . Cuando un agonista α_1 -adrenérgico se une a su receptor se induce la liberación del GDP y éste

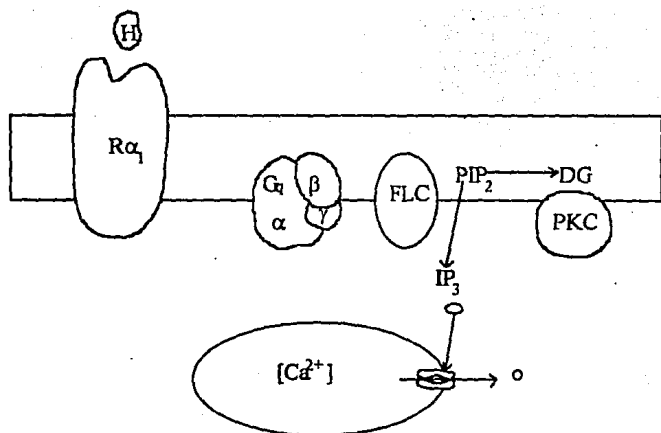


Figura 7.

Modelo del sistema de transducción de los fosfoinosítidos-calcio.

H, hormona; $R\alpha_1$, receptor α_1 -adrenérgico; $G\alpha$, proteína G; FLC, fosfolipasa C; PIP_2 , Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato; IP_3 , inositol 1,4, 5 trisfosfato; DG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C.

es remplazado por GTP. El complejo α -GTP se disocia de las subunidades β/γ y en este estado la subunidad α -GTP interactúa con la proteína efectora del sistema: la fosfolipasa C. La hidrólisis de GTP a GDP, por la actividad de GTPasa de la subunidad α , resulta en la reasociación con el complejo β/γ . De esta forma, la activación de la proteína G requiere de la asociación de GTP a la subunidad α y la inactivación de su hidrólisis a GDP (Kobilka, 1992; Summers & McMartin, 1993).

Por lo que respecta a la proteína efectora de este sistema, al menos ocho isoenzimas de la fosfolipasa C (PLC) han sido aisladas, con un rango de peso molecular entre 60 y 154 KDa. Las enzimas de mayor peso molecular son abundantes en cerebro, aunque una isoenzima de 148 KDa ha sido descrita en corazón, hígado y riñón (Crooke & Bennett, 1989; Summers & McMartin, 1993). Las enzimas de menor peso molecular se localizan principalmente en tejidos periféricos. Hasta el momento, se han identificado tres miembros de la familia de la fosfolipasa C: β , γ y δ , cada uno con varias isoformas y, recientemente, se ha propuesto la existencia de otros dos tipos de PLC, la α y la ϵ . De especial interés han resultado las isoformas de PLC- β (β 1-4), reguladas por proteínas G, y la PLC- γ , por tirosina cinasas. Para la PLC- β el patrón de regulación por las subunidades α y β/γ , es característico de cada isoenzima. Por estudios de reconstitución se demostró que la subunidad α_q , de la familia de proteínas G_q (que incluye α_q , α_{11} y α_{16}), activa a tres de las isoformas de PLC- β . Mientras que la fosfolipasa C- β 1 y la - β 3 exhibieron una gran respuesta, la PLC- β 2, bajo las mismas condiciones, demostró una débil activación por las subunidades α_q (Hepler, *et al.*, 1993; Kozasa, *et al.*, 1993; Smrcka & Sternweis, 1993). Estas subunidades α carecen del sitio de modificación covalente para la toxina pertusis, por lo que son insensibles a ella. Por su parte, el complejo β/γ es capaz de estimular directamente a las tres isoenzimas de la PLC- β , pero la PLC- β 2 y la PLC- β 3 muestran una mucho mayor respuesta que la isoforma - β 1, sugiriéndose, además, que la PLC- β 2 es regulada primordialmente por el complejo β/γ . El orden de potencia sugerido para la activación de estas isoformas por β/γ es el siguiente: PLC- β 3 > PLC- β 2 > PLC- β 1 (Smrcka & Sternweis, 1993; Neer, 1994; Sternweis, 1994).

En experimentos que examinan la regulación de la actividad de la PLC por combinaciones de α_q y β/γ (Srncka & Sternweis, 1993) y que analizan las formas truncadas de la enzima (Park, *et al.*, 1993; Wu, *et al.*, 1993) indican que el sitio de acción de β/γ es distinto del de la subunidad α_q . Los estudios con las formas truncadas de la PLC muestran que la porción carboxilo terminal de la enzima es requerida para la estimulación por α_q , pero no por el complejo β/γ , el cual se une a la región amino terminal (Neer, 1994). Así, la activación de receptores acoplados al sistema de transducción de los fosfoinosítidos-calcio, como los α_1 -adrenérgicos, pueden activar a la fosfolipasa C por acción de α_q -GTP como por el complejo β/γ . Hasta el momento se ha demostrado, por estudios de transfección y reconstitución, que los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (α_{1B} , α_{1C} y α_{1D}) activan a la PLC- $\beta 1$ a través de α_q y α_{11} . También, estos subtipos pueden activar a esta misma isoenzima a través de las subunidades α_{14} y α_{16} , activación que depende del tipo de receptor y de subunidad α . El subtipo α_{1B} activa a la isoenzima de manera sinérgica a través $G\alpha_{14}$ o $G\alpha_{16}$. Sin embargo, el subtipo α_{1C} sólo es efectivo en activar a la enzima cuando interacciona con α_{14} y el subtipo α_{1D} presenta una pequeña respuesta con ambas subunidades α (Wu, *et al.*, 1992).

Blitzer, *et al.* demostraron recientemente que una proteína G, diferente a la de la familia de las G_q , puede acoplarse también al receptor α_{1B} -adrenérgico para activar a la PLC cuando este receptor se expresa en ovocitos de *Xenopus laevis* (Blitzer, *et al.*, 1993). Esta proteína, conocida como G_o , pertenece a la familia de las G_i , que se acoplan de manera inhibitoria a la enzima adenilato ciclasa y se caracteriza por ser sensible a la ADP-ribosilación por la toxina pertusis. Estos resultados permiten proponer la existencia de diversos mecanismos por los que los receptores α_1 -adrenérgicos, al ser activados, transmiten la señal al interior celular.

Mucho del interés de los estudios realizados sobre los receptores α_1 -adrenérgicos, se ha centrado en la caracterización del sistema transduccional activado por cada subtipo y en tratar de hallar el significado real de la existencia de diversos subtipos de receptores. De esto, se ha sugerido, que existen al menos dos mecanismos de transducción diferentes entre los subtipos α_1 . El primero de ellos es

el que se activa por el subtipo α_{1B} , el cual consiste en la estimulación del recambio de fosfoinosítidos y la formación de los segundos mensajeros diacilglicerol e IP_3 y la movilización de calcio intracelular, por acción del IP_3 (Tsujiyamoto, *et al.*, 1989; Michel, *et al.*, 1989; Torres-Márquez, *et al.*, 1991). El segundo mecanismo postulado es el mediado por el subtipo α_{1A} -adrenérgico, el cual activa canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas presentes en la membrana plasmática y provoca el influjo del Ca^{2+} extracelular, como un evento inicial, y la formación de fosfatos de inositol, como proceso secundario. (Tsujiyamoto, *et al.* 1989; Han, *et al.*, 1987; Minneman, 1988; Suzuki, *et al.*, 1990).

Los receptores α_1 -adrenérgicos también se hallan implicados en la activación de otras rutas de transducción de señales como es la liberación de ácido araquidónico, producto de la hidrólisis de fosfatidilcolina, efecto mediado por la enzima fosfolipasa A_2 a través de una proteína G sensible a la toxina pertusis (Burch, *et al.*, 1986). La fosfolipasa A_2 se activa por la mayoría de los agonistas que inducen la hidrólisis de los fosfoinosítidos. El ácido araquidónico formado es un importante precursor de prostaglandinas y otros eicosanoides. Los productos primarios de la hidrólisis de fosfatidilcolina son ácidos grasos cis-insaturados y lisofosfatidilcolina, los cuales son importantes potenciadores de la activación de la proteína cinasa C (Nishizuka, 1992).

Por otra parte, la fosfolipasa D también puede activarse por acción α_1 -adrenérgica, posiblemente a través de una proteína G (Llahi & Fain, 1992). Esta enzima produce ácido fosfatídico por hidrólisis de fosfatidilcolina, que es posteriormente convertido a diacilglicerol por la fosfomonoesterasa del ácido fosfatídico (revisado en Nishizuka, 1992).

La participación de las fosfolipasas A_2 y D en la acciones de las catecolaminas y otras hormonas y neurotransmisores acoplados estimulatoriamente al sistema de los fosfoinosítidos-calcio, al parecer, incrementan la prolongada activación de la proteína cinasa C esencial para respuestas tan importantes como lo son la proliferación celular y la diferenciación, observada en algunos modelos celulares (Nishizuka, 1992).

ANTECEDENTES

En los vertebrados, las catecolaminas (norepinefrina y epinefrina) liberadas en respuesta a la activación del sistema nervioso simpático ejercen importantes funciones reguladoras sobre el metabolismo hepático. Estudios en hígado de mamíferos, principalmente en roedores, han demostrado que estas hormonas se unen a receptores presentes en la membrana plasmática. Por estudios de fijación de ligandos adrenérgicos radioactivos, en hígado de rata, se encontró que del total de receptores adrenérgicos que se expresan del 75 al 80% corresponden a los α_1 , del 15 al 20% a los α_2 , del 5 al 8% a los β_2 y que los β_1 no se expresan en estas células (Minneman, *et al.*, 1979; Hoffmann, *et al.*, 1981; Hoffmann & Lefkowitz, 1980; Exton, 1981), aunque estudios recientes indican que un pequeño porcentaje de los receptores β_1 (cerca de un 10 %) se expresan en hígado de ratas recién nacidas y que éste parece incrementarse en ratas maduras y senescentes (Van Ermen, *et al.*, 1992). La distribución de los receptores α_1 y β_2 -adrenérgicos en células hepáticas de otras especies diferentes a la rata y la filogenia de este receptor fue estudiada por Sulakhe y colaboradores (1988), quienes sugirieron que el receptor β es el más primitivo de los receptores adrenérgicos, expresados en tejido hepático, ya que de las diversas especies estudiadas de los cuatro grupos de vertebrados (anfibios, reptiles, aves y mamífero) todos expresaron el receptor β -adrenérgico, mientras que el α_1 sólo fue detectado en aves y mamíferos, que además coexpresan también el β . Estos resultados sugirieron que el receptor α_1 -adrenérgico tiene un origen filogenético más reciente que el receptor β y que probablemente, esto se deba a que la evolución de los receptores α_1 -adrenérgicos se encuentra asociada al desarrollo del sistema nervioso simpático sobre el control de las funciones hepáticas (Sulakhe, *et al.*, 1988).

Otro hallazgo interesante son los estudios realizados sobre la expresión de estos receptores en tejido hepático durante el desarrollo embrionario de la rata (McMillian, *et al.*, 1983). Así, durante los primeros estadios del desarrollo fetal el

receptor β -adrenérgico se expresa de manera predominante, mientras que el receptor α_1 experimenta un incremento postnatal, el cual en el estado adulto predomina sobre el otro tipo de receptor adrenérgico (Blair, *et al.*, 1979).

De esta forma la existencia de receptores α_1 adrenérgicos en células hepáticas de vertebrados menores (anfibios, peces y reptiles) aún no ha sido reportada. Algunos autores han sido incapaces de probar la existencia de receptores α_1 adrenérgicos implicados en la regulación del metabolismo de glucógeno (glucogenólisis), respuesta modulada principalmente, por el receptor β -adrenérgico (Birbaum, *et al.*, 1976; Janssens, *et al.*, 1986; Janssens & Grigg, 1987; Janssens & Lowrey, 1987; Fabbri, *et al.*, 1992; Janssens & Grigg, 1992). Estudios de fijación con [3 H]prazosina tampoco demostraron la existencia de estos receptores en membranas hepáticas de anfibios (axolotl y sapo) (Janssens & Grigg, 1988), carpas (Janssens & Lowrey, 1987) o peces pulmonados (Janssens & Grigg, 1988). Por ello, se sugiere que en vertebrados menores, las acciones de los agentes adrenérgicos ejercen sus efectos a través de los receptores β -adrenérgicos y que los α_1 no son importantes en la regulación de las funciones hepáticas.

Muy recientemente, se reportó que las catecolaminas modulan las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} , proponiéndose la participación de receptores α_1 , o similares a estos en la modulación de esta respuesta en hepatocitos de dos especies de pez gato (*Ictalurus nebulosus* e *Ictalurus melas*) y en la anguila americana, *Anguilla rostrata* (Zhang, *et al.*, 1992a; Zhang, *et al.*, 1992b; Moon, *et al.*, 1993).

Resultados controversiales e interesantes sobre el papel que pudiera tener el incremento en el calcio intracelular proponen que este ion, al parecer, no tiene ningún efecto en la regulación de la glucogenólisis hepática en peces (Birbaum, *et al.*, 1979; Janssens & Lowrey, 1987).

Kleineke y Janssens (1993), por su parte, reportaron que en células hepáticas de axolotl, las hormonas [Arg^8]vasotocina, que en anfibios es un análogo de la vasopresina, glucagon, isoprenalina y epinefrina estimulan la formación de AMPc y

provocan, además, un incremento en la concentración intracelular de calcio. Sin embargo, este incremento no es debido a la movilización del catión de depósitos intracelulares por acción del segundo mensajero IP_3 , sino que se debe a un aumento en el influjo del medio extracelular, evento al parecer regulado por el incremento en el AMPc.

OBJETIVOS

Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el incremento en la concentración intracelular de calcio, observado en diferentes especies de pez gato, es modulado por receptores α_1 -adrenérgicos, a través de la activación de la clásica señal de transducción de estos agentes, la cual hasta el momento no ha sido demostrada en vertebrados menores.

Para ello se propone la caracterización de la respuesta α_1 -adrenérgica en hepatocitos del pez gato *Ictalurus punctatus*, con los siguientes objetivos específicos:

- a) El subtipo de receptor α_1 - involucrado en la movilización del calcio intracelular, ya que la caracterización en tejido hepático de mamíferos muestra una clara heterogeneidad en la expresión de los subtipos α_1 -adrenérgicos (García-Sáinz, *et al.*, 1992a; García-Sáinz, *et al.*, 1994).
- b) El sistema de transducción acoplado a la activación de estos receptores
- c) El número y propiedades farmacológicas de estos adrenorreceptores.

MATERIALES Y METODOS

Químicos. Se utilizaron los siguientes compuestos: (-) Epinefrina, (-)norepinefrina, oximetazolina, prazosina y DL-propranolol de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo. U.S.A.). Benoxatian, 5-metil urapidil, cloroetilclonidina y WB 4101 de Research Biochemicals Inc. (Natick, MA. U.S.A.). Fentolamina (Ciba-Geigy), metoxamina (Burroughs Wellcome) y (+) niguldipina (Byk Gulden), fueron donadas de las correspondientes compañías. [¹²⁵I] HEAT (2200 Ci/mmol) y [2-³H]-Myo inositol (20 Ci/mmol) de New England Nuclear (Boston, MA. U.S.A.).

Animales. Peces gato de la especie *Ictalurus punctatus*, de un peso aproximado de entre 200 y 300g, fueron comprados de una granja localizada en el estado de Michoacán y mantenidos en el Centro Acuícola "La Paz". Los animales fueron trasladados al laboratorio de 4 a 5 días antes de los experimentos y puestos en tanques de aproximadamente 100 litros de agua potable declorinada y aerada, a temperatura ambiente. Los animales fueron alimentados con alimento comercial para peces en hojuela y pellet.

Células. Los hepatocitos se aislaron por el método de perfusión con colagenasa (Moon, *et al.*, 1985). El hígado fue perfundido vía la vena cava, por 15 minutos con la siguiente solución amortiguadora para pez, que carecía de calcio: NaCl 136 mM, KCl 5.4 mM, MgSO₄ 0.81 mM, NaHCO₃ 5 mM, Na₂HPO₄ 0.33 mM, HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico) 10 mM. El pH se ajustó a 7.63 (Moon, *et al.*, 1993). El hígado fue digerido con colagenasa (1.06 mg/ml) durante 45 minutos en la solución amortiguadora para pez con 1.5 mM de CaCl₂ y la suspensión de células obtenidas se lavaron 3 veces en el amortiguador con calcio. La densidad de la suspensión fue alrededor de 100 mg de células por mililitro y la viabilidad de las células se evaluó por la prueba de exclusión de azul de tripán, observadas al microscopio óptico (mayor del 95%). Las incubaciones para todos los ensayos se realizaron en la solución amortiguadora para pez con 1.5 mM de calcio a temperatura ambiente.

Medición de Ca^{2+} intracelular. El indicador fluorescente indo-1 fue utilizado como un señalador de los cambios de Ca^{2+} intracelular, de acuerdo a Staddon y Hansford (1986), con algunas modificaciones: las células (20 mg de peso húmedo por ml) fueron incubadas con 10 μ M de indo-1/AM en el amortiguador para pez adicionado con 1.5 mM de $CaCl_2$ por 30 minutos, a temperatura ambiente y lavadas con la misma solución amortiguadora. Se empleó una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 400 nm. La fluorescencia fue registrada en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman, equipado con una cámara con temperatura regulable y un agitador magnético.

Medición del recambio de fosfolípidos. El marcaje de fosfatidilinositol (PI) se realizó incubando las células (50 mg de peso húmedo por ml) por 60 minutos, en una solución amortiguadora para pez adicionada con 1.5 mM de $CaCl_2$, carente de fosfato de sodio y suplementada con 10 μ Ci/ml de [32 P]Pi. Al final de la incubación, los lípidos fueron extraídos con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1) y los fosfolípidos separados por una cromatografía en capa fina (García-Sáinz & Fain, 1980). En algunos experimentos, la producción de fosfato de inositol se estudió de la siguiente manera: las células (50 mg de peso húmedo por ml.) fueron incubadas por 90 minutos con 15 μ Ci/ml de inositol tritiado. Después de este tiempo las células se lavaron con el mismo amortiguador libre de fosfato de sodio y se incubaron por 10 minutos con 10 mM de LiCl. Las hormonas fueron adicionadas y después de 5 minutos, se detuvo la reacción con ácido tricloroacético al 80%. Los fosfatos de inositol se separaron por una cromatografía de intercambio aniónico (García-Sáinz & Macías-Silva, 1990).

Obtención de membranas. Las membranas plasmáticas de hepatocitos del pez gato se obtuvieron por homogenización del tejido en una solución hipotónica alcalina ($NaHCO_3$ 1mM) de acuerdo al método de Neville (1968), centrifugando el homogenado a baja velocidad (9,000 rpm) durante 15 minutos, y separando las membranas por flotación, por medio de un gradiente discontinuo de sacarosa (a 25,000 rpm) durante 150 min. Las membranas aisladas de esta forma fueron lavadas y resuspendidas en una solución amortiguadora Tris 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.5, se colocaron en alícuotas de 1 ml y se congelaron en nitrógeno líquido en

donde permanecieron hasta su uso. La cuantificación de la proteína presente en las membranas, se realizó por el método de Lowry, *et al.*, (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

Ensayos de fijación del ligando radioactivo [¹²⁵I]HEAT (Binding).

Los estudios de "binding" fueron realizados por incubación de las membranas (100 µg de proteína) en una solución amortiguadora Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA, 5 mM, en cualquiera de las tres condiciones siguientes: con el agente radioactivo [¹²⁵I]HEAT, en ausencia de éste o con los agonistas o antagonistas que se indican para cada caso. Las incubaciones fueron realizadas en un volumen de 250 µl durante 60 minutos, en un baño de agua con agitación constante a 25 °C. Al final de la incubación se detuvo la reacción por la adición de 5 ml de buffer frío y las membranas fueron inmediatamente separadas por filtración al vacío a través de filtros de fibra de vidrio GF/C previamente remojados en polietilénimina al 0.3%, para decrementar la unión no específica en el filtro. Los filtros fueron lavados 3 veces con 5 ml de solución amortiguadora fría cada vez y se cuantificó la cantidad de radioligando unido a los receptores en un contador de radiación gama ([¹²⁵I]).

Para los experimentos de saturación, se utilizaron concentraciones crecientes en el rango de 5 a 500 pM de [¹²⁵I]HEAT. La unión no específica se determinó en presencia de 10 µM de fentolamina (antagonista selectivo α_1 -adrenérgico); por otra parte, la unión específica se determinó por la diferencia entre la cantidad de [¹²⁵I]HEAT total unido (pegado total) y la unión no específica. La unión específica representó del 60 al 70 % del pegado total en la K_D . Para los ensayos de competencia se utilizó una concentración de entre 100 y 200 pM del mismo radioligando, que corresponde del 50 al 60% de ocupación de los receptores, incubando las membranas en presencia de los siguientes agonistas: epinefrina, norepinefrina, metoxamina y oximetazolina o los antagonistas: prazosina, fentolamina, 5-metil urapidil, WB4104, benoxatian y (+)niguldipina, en las concentraciones que se indican para cada ensayo. Los datos obtenidos de los estudios de saturación y competencia se analizaron con el programa EBDA (Biosof-Elsevier). Los valores de las K_s se calcularon de acuerdo a Cheng y Prusoff (1973).

RESULTADOS

Efecto de la acción de agentes α_1 -adrenérgicos sobre el $[Ca^{2+}]_i$.

En hepatocitos del pez gato, *Ictalurus punctatus*, la activación por agentes α_1 -adrenérgicos induce un claro incremento en la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$). En la figura 1 se presenta un trazo representativo de esta respuesta, en donde la norepinefrina, en presencia de propranolol (un antagonista β -adrenérgico), induce un incremento inmediato en el $[Ca^{2+}]_i$ seguido por un rápido decremento en función de la concentración de agonista utilizado; este patrón se repite una o dos veces de una manera oscilatoria, observándose además que la magnitud de los picos disminuye gradualmente en función del tiempo, retomando cerca de su nivel basal hasta los 5 minutos en que el trazo fue calibrado.

El efecto de norepinefrina fue dependiente de la dosis (fig. 2), alcanzando un máximo de 2 a 3 veces sobre el nivel basal (de un valor basal de 122 ± 7 nM a un incremento de 250-350 nM). La epinefrina fue tan potente y efectiva como la norepinefrina, en contraste a la oximetazolina la cual no presentó efecto a las concentraciones utilizadas y a la metoxamina, que induce un pequeño incremento del $[Ca^{2+}]_i$ sólo a concentraciones elevadas (fig. 2).

El incremento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$, producido por $10 \mu\text{M}$ de norepinefrina, en presencia de $10 \mu\text{M}$ de propranolol, fue inhibido por una serie de antagonistas reversibles α_1 -adrenérgicos, con el siguiente orden de potencia: WB 4101 > benoxatán \geq 5-metil urapidil > fentolamina > (+)niguldipina (fig 3). El efecto de prazosina no pudo ser evaluado debido a su alta fluorescencia intrínseca.

El efecto del antagonista irreversible cloroetilclonidina (CEC) fue también evaluado. Este compuesto es muy útil por su selectividad para distinguir entre los diferentes subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos (Minneman, 1988). La preincubación con $100 \mu\text{M}$ de CEC por 30 minutos disminuyó la magnitud de la

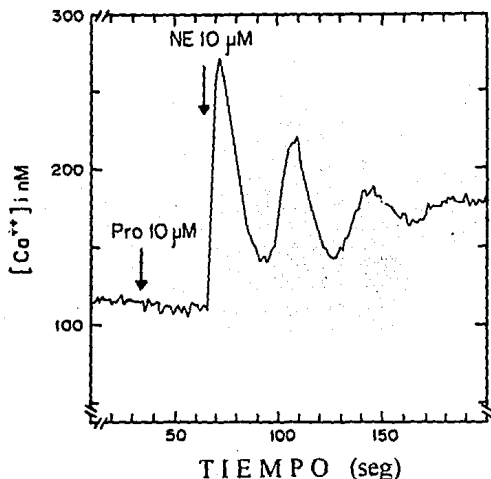


Figura 1.

Efecto de agentes adrenérgicos sobre el Ca^{2+} intracelular. Las células (20 mg de peso húmedo por mililitro) fueron preincubadas con $10 \mu\text{M}$ de indo-1/AM como se indica en los Materiales y Métodos, lavadas y resuspendidas en el amortiguador para pez adicionado con 1.5 mM de CaCl_2 . Las células fueron colocadas en cubetas de 4 ml y equilibradas en el fluorómetro, en donde fue adicionado $10 \mu\text{M}$ de propranolol (Pro), seguido por $10 \mu\text{M}$ de norepinefrina (NE). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. El trazo es representativo de entre 6 y 8 experimentos con diferentes preparaciones celulares.

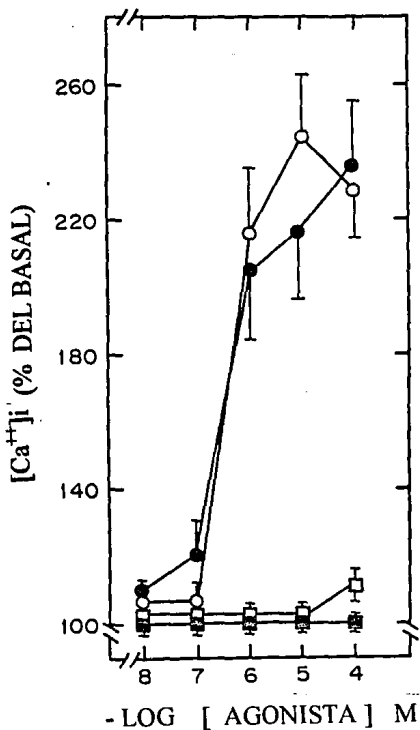


Figura 2.

Efecto de agonistas α_1 -adrenérgicos sobre el Ca^{2+} intracelular. Las células (20 mg de peso húmedo por mililitro) fueron preincubadas con $10 \mu\text{M}$ de indo-1/AM como se indica en los Materiales y Métodos, lavadas y resuspendidas en el amortiguador para pez con 1.5 mM de CaCl_2 . Las células fueron colocadas en cubetas de 4 ml y equilibradas en el fluorómetro, en donde fueron incubadas con diferentes concentraciones de norepinefrina (círculos vacíos), epinefrina (círculos oscuros), ambas en presencia de $10 \mu\text{M}$ de propranolol, metoxamina (cuadros vacíos) y oximetazolina (cuadros oscuros). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como el porciento de la concentración basal de Ca^{2+} intracelular, el cual fue de $126 \pm 22 \text{ nM}$. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de entre 6 y 8 experimentos, utilizando diferentes preparaciones celulares.

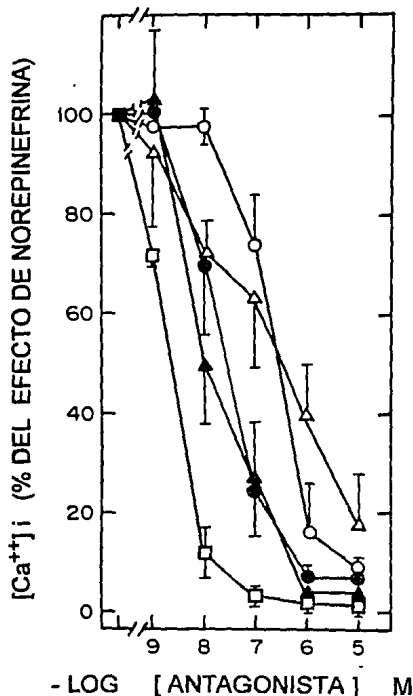


Figura 3.

Efecto de antagonistas α_1 -adrenérgicos sobre el incremento del Ca^{2+} intracelular, inducido por norepinefrina. Las células (20 mg de peso húmedo por ml) fueron preincubadas con $10 \mu\text{M}$ de indo-1/AM como se indica en los Materiales y Métodos, lavadas y resuspendidas en el amortiguador para pez con 1.5 mM de CaCl_2 . Posteriormente, las células fueron colocadas en cubetas de 4 ml y equilibradas en el fluorómetro, en donde se incubaron en presencia de $10 \mu\text{M}$ de propranolol y la diferentes concentraciones que se indican de: WB 4101 (cuadros vacíos), benoxatian (triángulos oscuros), 5-metil urapidil (círculos oscuros), fentolamina (círculos vacíos) o (+)niguldipina (triángulos vacíos), por 1 ó 2 minutos. Después de esta incubación se adicionó $10 \mu\text{M}$ de norepinefrina. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar de entre 6 y 8 experimentos, utilizando diferentes preparaciones celulares.

respuesta a norepinefrina (en presencia de 10 μM de propranolol) y claramente recorrió la curva hacia la derecha (fig. 4). El basal no fue afectado por el pretratamiento de las células con CEC.

Caracterización del sistema transduccional acoplado a las acciones α_1 -adrenérgicas. Se evaluó el efecto de la norepinefrina sobre la producción de fosfatos de [^3H]inositol en células premarcadas con inositol tritiado, observándose solamente un pequeño incremento en la producción de IP_3 (entre un 30 y un 40% sobre el nivel basal). De manera contrastante se observó un claro efecto de concentraciones crecientes de norepinefrina en el marcaje del fosfatidilinositol (PI), en presencia de 10 μM de propranolol (fig. 5A), estimulación cercana a 2.5 veces sobre el nivel basal. El marcaje del PI es un indicador de la resíntesis de este fosfoinosítido, evento que es secundario a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. El efecto de 10 μM de norepinefrina (en presencia de propranolol) fue bloqueado completamente por 10 μM de prazosina (fig. 5B). El antagonista prazosina, por sí mismo, no presentó ningún efecto sobre el marcaje de PI.

Identificación de sitios α_1 -adrenérgicos y caracterización farmacológica del subtipo de receptor por ensayos de binding. En las membranas hepáticas del pez gato *Ictalurus punctatus*, aisladas por gradiente de sacarosa, se caracterizó al receptor α_1 -adrenérgico por ensayos de asociación de ligandos radioactivos. Al utilizar concentraciones crecientes del radioligando [^{125}I]HEAT, se observó una unión rápida, reversible y saturable, como se demuestra en la fig. 6. El análisis de Scatchard describió un comportamiento lineal, como se observa en la gráfica insertada en la fig. 6. Esto demuestra la existencia de una población pequeña de sitios homogéneos de receptores α_1 -adrenérgicos (aproximadamente 33 finol/mg de proteína), que presentan, además, una alta afinidad para el [^{125}I]HEAT ($K_D = 100$ pM) (ver tabla 1).

También fué valorado el efecto del antagonista irreversible cloroetilclonidina sobre el ensayo de fijación del radioligando [^{125}I]HEAT. Para ello, las membranas fueron preincubadas en presencia o ausencia de 10 μM de este agente alquilante

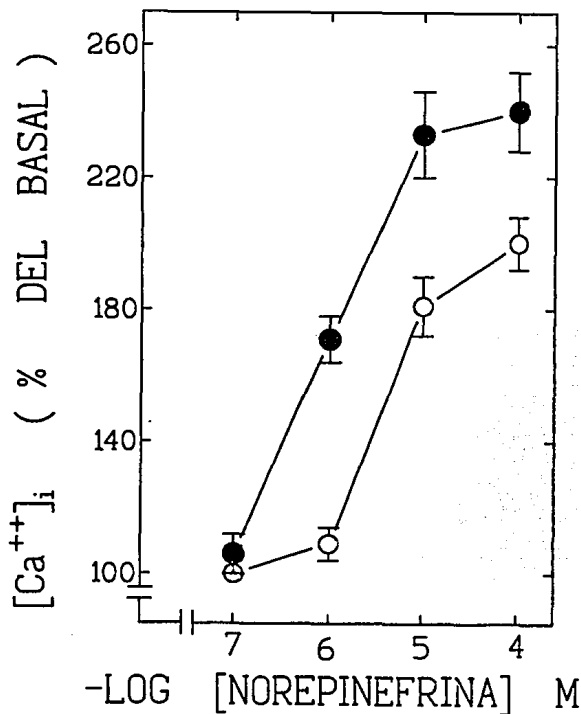


Figura 4.

Efecto de la preincubación con cloroetilclonidina sobre el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, inducido por norepinefrina. Las células (20 mg de peso húmedo por ml) fueron preincubadas por 30 minutos con el indo-1/AM, en ausencia (círculos oscuros), o presencia de 100 μ M de cloroetilclonidina (círculos vacíos) en el amortiguador para pez adicionado con 1.5 mM de $CaCl_2$. Después de la preincubación, las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de norepinefrina en presencia de 10 μ M de propranolol. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Los datos representan el promedio \pm el error estándar de entre 6 y 8 experimentos, utilizando diferentes preparaciones celulares.

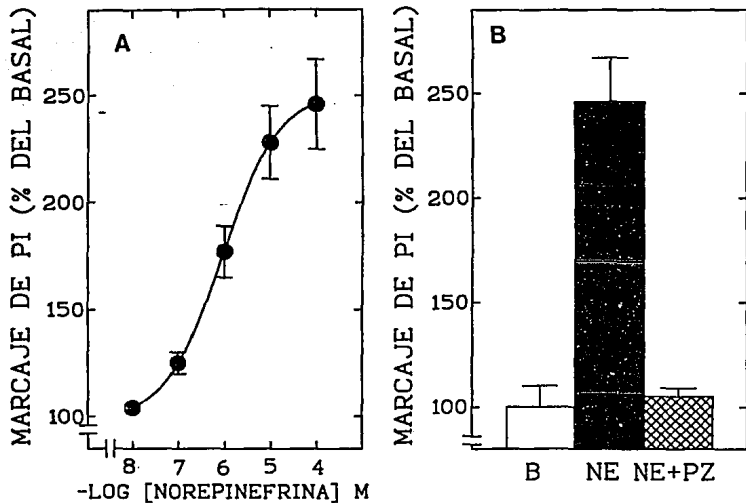


Figura 5.

Efecto de agentes α_1 -adrenérgicos sobre el marcaje de fosfatidilinositol (PI). Las células (50 mg de peso húmedo por ml) se incubaron durante 1 hr con 10 μ Ci de [32 P], a temperatura ambiente, de acuerdo a las siguientes condiciones: **Panel A:** En presencia de 10 μ M de propranolol y diferentes concentraciones de norepinefrina. **Panel B:** En ausencia (B), o presencia de 10 μ M de norepinefrina (NE) o de 10 μ M de norepinefrina más 10 μ M de prazosina (NE + PZ). Los resultados se expresan como el porcentaje del marcaje basal de PI, el cual fue de 307 ± 30 cpm/100 mg de células de peso húmedo. La gráfica representa el promedio \pm el error estándar de 5 experimentos, usando diferentes preparaciones celulares.

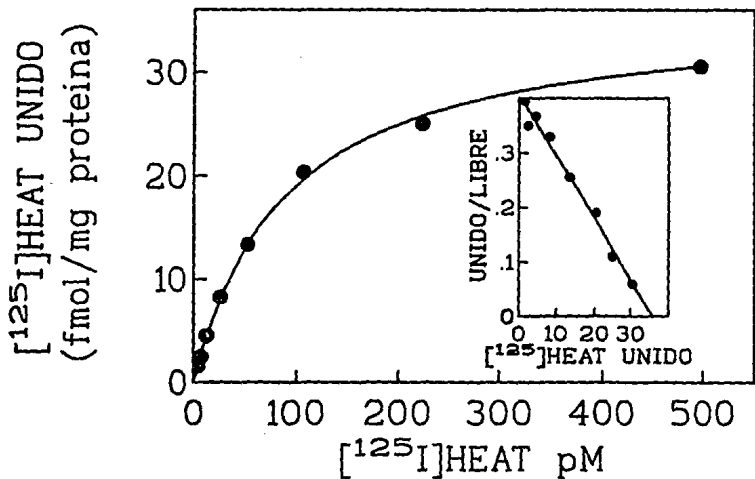


Figura 6.

Curva de saturación de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$, utilizando membranas hepáticas de pez. Las membranas (100 μg de proteína) fueron incubadas con concentraciones crecientes de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$, a temperatura ambiente durante 1 hr en el amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM. La gráfica representa la unión específica de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ a receptores α -adrenérgicos que se determinó por la diferencia entre la cantidad de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ total unido (pegado total) y la unión no específica, determinada por la presencia de 10 μM de fentolamina. El análisis de Rosenthal de la misma curva se inserta en la gráfica. La figura es representativa de 5 experimentos, utilizando diferentes preparaciones celulares.

Tabla 1. Parámetros de las gráficas de saturación de [¹²⁵]HEAT, en membranas hepáticas de pez.

<i>Tratamiento</i>	<i>K_D</i> (<i>μM</i>)	<i>B_{max}</i> (<i>fmol/mg</i>)
Sin Incubar (5)	100 ± 23	33 ± 3
Preincubadas solas (4)	57 ± 7	18 ± 1
Preincubadas con CEC (4)	64 ± 10	9 ± 1

Los resultados representan el valor promedio ± el error estándar de entre 4 y 5 experimentos, utilizando diferentes preparaciones de membranas para cada caso. CEC, cloroetilclonidina. B_{max}, fijación máxima.

durante 30 minutos a temperatura ambiente, al término del cual se lavaron varias veces y se utilizaron para los ensayos de saturación con [¹²⁵I]HEAT. La preincubación por sí misma, disminuyó el pegado total (aproximadamente un 40% con respecto a los experimentos de saturación). Sin embargo, el pretratamiento con CEC solo disminuyó la B_{max}, sin alterar de manera importante la afinidad del receptor (fig. 7 y tabla 1). La utilización de una concentración mayor de CEC (100 μM) disminuyó por completo el pegado del [¹²⁵I]HEAT.

La caracterización del subtipo de receptor se realizó con la utilización de agonistas y antagonistas α₁-adrenérgicos, mediante la técnica de desplazamientos por "binding", la cual consiste en utilizar una concentración fija de [¹²⁵I]HEAT, alrededor de la K_D (entre 100 y 200 pM) y utilizar concentraciones crecientes de los agonistas y antagonistas. Como resultado de estos estudios se obtuvieron las curvas de competencia ilustradas en las figuras 8 (agonistas) y 9 (antagonistas). Los valores de las K_is se muestran en la tabla 2 y en base a estos valores, el orden de potencia para desplazar la unión de [¹²⁵I]HEAT fue:

- 1) Para agonistas: oximetazolina > epinefrina ≥ norepinefrina > metoxamina.
- 2) Para antagonistas: prazosina > WB 4101 > benoxatian ≥ 5-metil urapidil > fentolamina > (+)niguldipina.

Para confirmar que la respuesta celular (incremento en el [Ca²⁺]_i) fue mediada por el mismo receptor identificado por los estudios de asociación del ligando radioactivo [¹²⁵I]HEAT, se realizó un análisis de correlación de los valores de las K_is de los estudios de competencia y de las IC₅₀ obtenidas de los experimentos de [Ca²⁺]_i, observándose una buena correlación entre estos valores (pendiente = 0.73 y r = 0.96), lo que sugiere que el receptor caracterizado por binding, corresponde al mismo involucrado en el incremento en los niveles de calcio intracelular (fig 10).

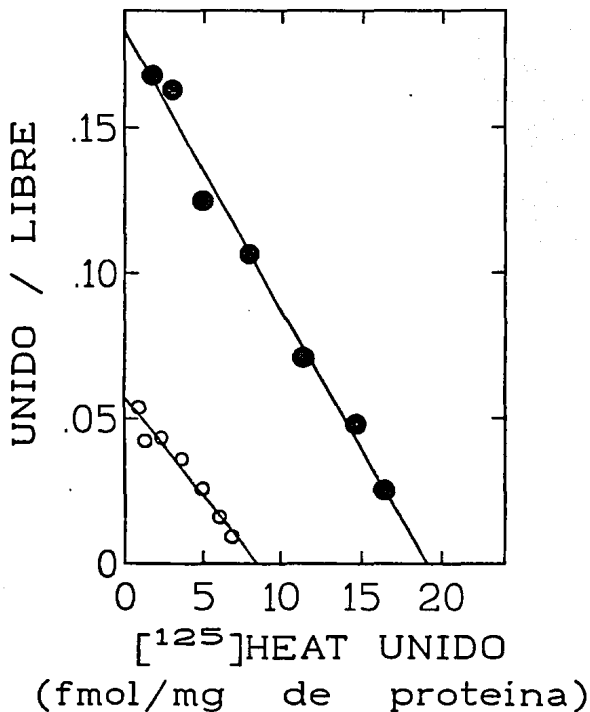


Figura 7.

Efecto del pretratamiento con cloroetilclonidina sobre los ensayos de fijación del ligando radioactivo [¹²⁵I]HEAT. Las membranas (100 μg de proteína) fueron preincubadas en un amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, a temperatura ambiente durante 1 hr en cualquiera de las siguientes condiciones: en ausencia (círculos oscuros), o presencia (círculos vacíos) de 10 μM de cloroetilclonidina. Después del tratamiento las membranas fueron lavadas varias veces con el mismo amortiguador y se realizaron experimentos de saturación, bajo las mismas condiciones en el ensayo anterior (figura 6). La gráfica representa el análisis de Rosenthal del pegado específico de las curvas de saturación. La figura es representativa de 4 experimentos, utilizando diferentes preparaciones celulares.

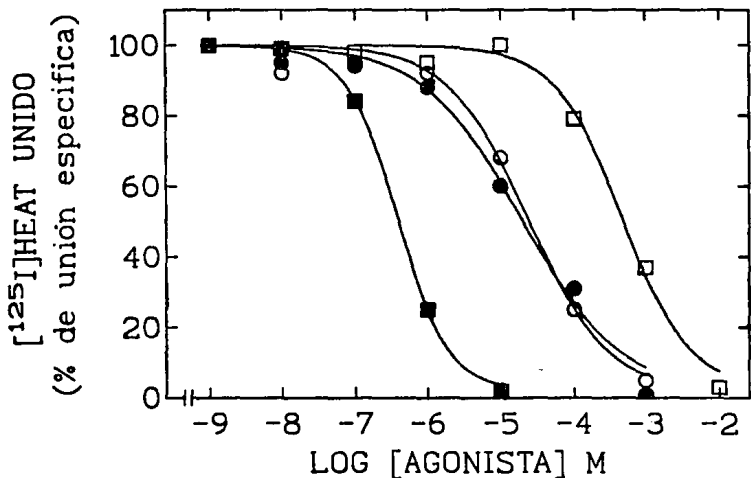


Figura 8.

Inhibición del pegado específico de [¹²⁵I]HEAT por agonistas α₁-adrenérgicos, utilizando membranas hepáticas de pez. Las membranas (100 μg de proteína) fueron incubadas en un amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, a temperatura ambiente durante 1 hr, en presencia de entre 100 y 200 pM de [¹²⁵I]HEAT y de diferentes concentraciones de los siguientes agonistas: oximetazolina (cuadros oscuros); epinefrina (círculos oscuros); norepinefrina (círculos vacíos); metoxamina (cuadros vacíos). La figura es representativa de entre 4 y 7 experimentos, usando diferentes preparaciones membranales.

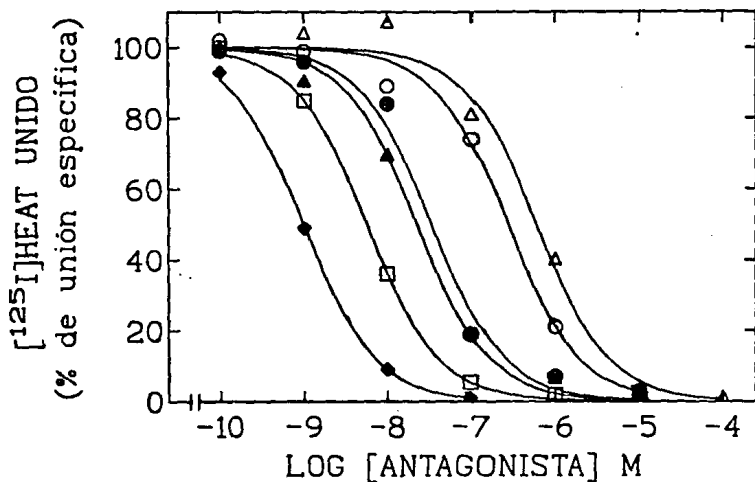


Figura 9.

Inhibición del pegado específico de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ por antagonistas α_1 -adrenérgicos, utilizando membranas hepáticas de pez. Las membranas (100 μg de proteína) fueron incubadas en un amortiguador Tris 50 mM, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM, a temperatura ambiente durante 1 hr, en presencia de entre 100 y 200 pM de $[^{125}\text{I}]\text{HEAT}$ y de diferentes concentraciones de los siguientes antagonista: prazosina (rombos oscuros); WB 4101 (cuadros vacíos); 5-metil urapidil (círculos oscuros); benoxatán (triángulos oscuros); (+)niguldipina (triángulos vacíos); fentolamina (círculos vacíos). La figura es representativa de entre 4 y 7 experimentos, usando diferentes preparaciones de membranas.

Tabla 2. Afinidades de los agonistas y antagonistas para receptores α_1 -adrenérgicos en membranas hepáticas de pez.

<i>AGENTES</i>	<i>K_i (nM)</i>	<i>Pendiente</i>
Agonista:		
Oximetazolina (4)	199 ± 12	1.06 ± 0.06
(-)Epinefrina (4)	7,530 ± 1,050	0.84 ± 0.05
(-)Norepinefrina (6)	9,960 ± 1,160	0.72 ± 0.05
Metoxamina (4)	242,000 ± 14,000	0.92 ± 0.04
Antagonistas:		
Prazosina (4)	0.69 ± 0.02	0.85 ± 0.04
WB4101 (7)	4.40 ± 1.00	0.87 ± 0.06
Benoxatian (5)	14 ± 5	0.90 ± 0.06
5-Metil urapidil (6)	20 ± 2	0.90 ± 0.04
Fentolamina (5)	98 ± 27	0.89 ± 0.04
(+)Niguldipina (5)	420 ± 67	1.00 ± 0.06

Los resultados son el promedio ± el error estándar, con el número de experimentos indicados entre paréntesis, usando diferentes preparaciones de membranas.

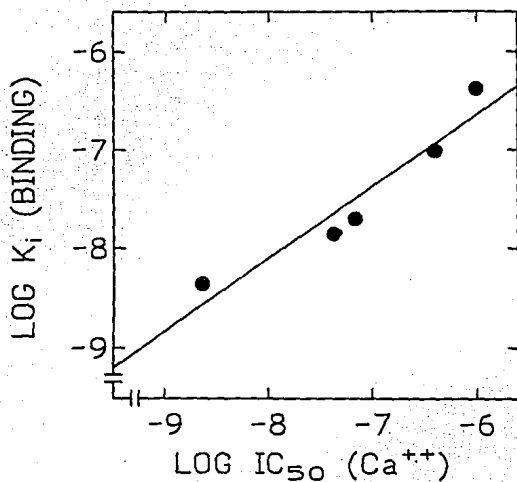


Figura 10.

Gráfica de correlación de los valores de K_i de los diferentes antagonistas contra los valores de IC_{50} obtenidos de los experimentos sobre $[Ca^{2+}]_i$ en membranas hepáticas de pez. Coeficiente de correlación = 0.96; pendiente = 0.73.

DISCUSION

En el presente trabajo se probó y caracterizó la existencia de receptores α_1 -adrenérgicos presentes en hepatocitos de pez gato *Ictalurus punctatus*, el subtipo α_1 -adrenérgico y el sistema de transducción de señales al que este receptor se acopla. Para ello se utilizaron diversas estrategias experimentales demostrándose claramente la existencia de receptores α_1 -adrenérgicos, que además modulan respuestas fisiológicas como el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} .

El incremento en la concentración de Ca^{2+} por agentes α_1 -adrenérgicos, confirma los anteriores reportes de Moon y colaboradores en las especies de pez gato *Ictalurus melas* e *Ictalurus nebulosus* (Zhang, *et al.*, 1992a; Zhang, *et al.*, 1992b; Moon, *et al.*, 1993).

Sin embargo, un estudio farmacológico más detallado de esta respuesta fisiológica, utilizando diversos agentes agonistas y antagonista α_1 -adrenérgicos, demuestra por primera vez la participación de receptores α_1 -adrenérgicos del subtipo α_{1B} , ya que, confirmando lo observado en otros estudios, la metoxamina y la oximetazolina presentan muy poco o ningún efecto en el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, en comparación con la alta actividad en células que expresan los subtipos α_{1A} y α_{1C} (García-Sáinz, *et al.*, 1985; Garcia-Sáinz, *et al.*, 1993), además de la sensibilidad que demostró esta respuesta al antagonista selectivo α_{1B} , cloroetilclonidina.

El patrón oscilatorio intracelular para el Ca^{2+} , por acción de norepinefrina (figura 1), ha sido observado en células individuales incluyendo hepatocitos de anguila (Zhang, *et al.*, 1992; Woods, *et al.*, 1986). Nuestros datos sugieren que los hepatocitos de *Ictarulus punctatus* responden de una manera sincronizada a la estimulación adrenérgica. Sin embargo, este comportamiento oscilatorio no ha sido observado en hepatocitos individuales de *Ictalurus nebulosus* (Zhang, *et al.*, 1992). Aunque no se conoce cual es la razón de tales diferencias, es muy probable que la

temperatura en que se realizan estos ensayos pueda estar jugando un papel importante en los resultados obtenidos. Los experimentos realizados en *Ictalurus nebulosus* fueron realizados a 10°C, mientras que nuestros experimentos se realizaron a 25°C. La disminución de la temperatura puede estar implicada en la inhibición de mecanismos de transporte activo más que en mecanismos de difusión pasiva, lo que resultaría en una reducción en la concentración de calcio que entra a través de estos mecanismos. Sin embargo, existen evidencias recientes de que las especies poiquilothermas, pueden tener mecanismos mucho menos sensibles a la temperatura que los mamíferos, lo que les permitiría mantener sus gradientes de calcio a temperaturas bajas (Bersohn, *et al.*, 1991), desconociéndose el significado real de este comportamiento oscilatorio.

La respuesta α_1 -adrenérgica se halla usualmente asociada al recambio de fosfoinosítidos, como mecanismo de transducción de señales al que se acopla este receptor (Fain & García-Sáinz, 1980; García-Sáinz, 1993). La activación del receptor α_1 -adrenérgico, presente en hepatocitos del pez gato, produjo un pequeño incremento en la producción del segundo mensajero IP_3 (cerca de 40% sobre el nivel basal). Debido a esto, se caracterizó de una manera más completa el sistema de transducción analizando el recambio de fosfatidilinositol (PI), que es un efecto secundario a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (Michell, 1975).

El incremento en la resíntesis de PI, por acción de norepinefrina, demuestra que las acciones adrenérgicas en hepatocitos del pez *Ictalurus punctatus* se ejercen a través de la activación de un receptor α_1 -adrenérgico que se acopla al sistema de transducción de los fosfoinosítidos-calcio. Al parecer este pequeño incremento en la concentración intracelular de IP_3 es suficiente para producir los cambios observados en el calcio intracelular, ya que en este caso la respuesta β -adrenérgica fue bloqueada por el antagonista selectivo propranolol, descartando un posible influjo de este ion del medio extracelular por acción del incremento en los niveles de AMP cíclico, como fue observado en un reporte previo por Kleineke & Janssens (1993) en hepatocitos de axolotl. Sin embargo, es de especial interés para nosotros, el analizar el papel del AMPc en el influjo del calcio extracelular en este modelo hepático.

Los ensayos realizados con la técnica de fijación del ligando radioactivo [125 I]HEAT, demostraron la existencia de un número pequeño de sitios homogéneos de receptores α_1 -adrenérgicos, comparado con el que se ha reportado en membranas hepáticas de otras especies (García-Sáinz, et al., 1994; García-Sáinz, et al., 1992a; Gutiérrez-Venegas & García-Sáinz, 1993; Han, et al., 1987; Taddei, et al., 1993). Las evidencias farmacológicas sugieren que el receptor caracterizado en esta especie de pez teleosteo pertenece al subtipo de receptor α_{1B} -adrenérgico. Entre las características que los distinguen de otros subtipos (García-Sáinz 1993), es su sensibilidad a la cloroetilclonidina y su relativa baja afinidad por los antagonistas reversibles niguldipina, benoxatian, WB 4101 y 5-metil urapidil. Sin embargo, no existe una clara identidad entre los valores de las K_i s obtenidos para esta especie y las obtenidas para el mismo receptor presente en otras especies, principalmente en aves y mamíferos, donde el receptor ha sido caracterizado en el mismo tejido (Gutiérrez-Venegas & García-Sáinz, 1993; García-Sáinz, et al., 1992a; García-Sáinz, et al., 1994). Por ejemplo, las afinidades para benoxatian ($K_i = 14$ nM) y 5-metil urapidil (20 nM) fueron mayores que las reportadas para el receptor α_{1B} , presente en membranas hepáticas de rata (73 nM y 262 nM, respectivamente), considerado como el subtipo prototipo α_{1B} (García-Sáinz, et al., 1994). A pesar de ello, los valores de las K_i s obtenidos para el subtipo α_{1B} de pez, se encuentran dentro de los reportados para este subtipo de adrenoceptor, ya que existe un rango de valores de las K_i s para cada antagonista (García-Sáinz 1993).

Es muy importante mencionar que la lipofiliidad de los radioligandos, de los agonistas y de los antagonistas utilizados en los ensayos de competencia, así como la cantidad y tipo de lípidos presentes en las membranas de las células de las diferentes especies, pueden contribuir a las variaciones observadas. Además, la sustitución de un solo aminoácido en la secuencia del receptor puede alterar la afinidad por uno o varios ligandos específicos (Okseberg, et al., 1992), dando como resultado las diferencias farmacológicas observadas entre receptores homólogos.

El análisis de correlación obtenido de los valores de las K_i s de los ensayos de competencia con antagonistas y de los valores de IC_{50} obtenidos de los estudios

sobre el $[Ca^{2+}]_i$, demuestra que este evento fisiológico es regulado por la activación de receptores α_{1B} -adrenérgicos.

Sin embargo, como ya se ha reportado para otros modelos hepáticos de vertebrados menores, la activación de este receptor no regula la glucogenólisis, ya que se realizaron una serie de experimentos en nuestro laboratorio que así lo demuestran. Este hecho deja a la expectativa por el momento, el papel de estos receptores en el metabolismo de los carbohidratos, tan importante en mamíferos y que es uno de nuestros objetivos a realizar como continuación de este trabajo.

La gran cantidad de estudios realizados sobre la caracterización de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos en células hepáticas de diversas especies de mamíferos indican una gran heterogeneidad; así, en hígado de rata (García-Sáinz, *et al.*, 1994; García-Sáinz, *et al.*, 1992a; Han, *et al.*, 1987a; Taddei, *et al.*, 1993), ratón (García-Sáinz, *et al.*, 1994) y hamster (García-Sáinz, *et al.*, 1994) se expresa el subtipo α_{1B} , mientras que en hepatocitos de conejo (García-Sáinz, *et al.*, 1992a; Taddei, *et al.*, 1993) y de humano (trabajo enviado a publicación) se expresa el subtipo α_{1C} . En hepatocitos de cerdo se expresa un receptor con las propiedades farmacológicas del subtipo α_{1A} (García-Sáinz, *et al.*, 1992a; García-Sáinz & Romero-Avila, 1993; Taddei, *et al.*, 1993), pero que por análisis de Northern blot hibridiza con la sonda del subtipo α_{1D} (García-Sáinz, *et al.*, 1992a). Por otra parte, el receptor que se expresa en aves es el α_{1B} -adrenérgico (Gutiérrez-Venegas & García-Sáinz, 1993).

El receptor caracterizado en el presente trabajo corresponde a un subtipo con propiedades farmacológicas y funcionales del α_{1B} , lo que permite proponer que en tejido hepático, este subtipo de receptor, es el más primitivo de los α_1 en términos evolutivos, desconociéndose por el momento la presencia de otros subtipos en anfibios y reptiles.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran la existencia de receptores α_1 -adrenérgicos en células hepáticas del pez gato *Ictalurus punctatus*, los cuales modulan el incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular y el recambio de fosfoinosítidos. La caracterización farmacológica de estos receptores sugiere que pertenecen al subtipo α_{1B} -adrenérgico.

BIBLIOGRAFIA

- Baldwin, J. M. (1994). Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Cur. Opin. Cell Biol.* 6: 180-190.
- Berridge, M. J. (1987). Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 159-193.
- Bersohn, M. M., Vemuri, R., Schuil, D. W., Weiss, R. S. & Philipson, K. D. (1991). Effect of temperature on sodium-calcium exchange in sarcolemma from mammalian and amphibian hearts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1062: 19-23
- Birnbaum, M. J., Schultz, J. & Fain, J. N. (1979). Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 231(1): 191-197.
- Blair, J. B., James, M. E. & Foster, J. L. (1979). Adrenergic control of glucose output and adenosine 3':5'-monophosphate levels in hepatocytes from juvenile and adult rats. *J. Biol. Chem.* 254: 7579-7584.
- Blitzer, R. D., Omri, G., De Vivo, M., Carty, D. J., Premont, R. T., Codina, J., Birnbaumer, L., Cotecchia, S., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J., Landau, E. M. & Iyengar, R. (1993). Coupling of the expressed α_{1B} -adrenergic receptor to the phospholipase C pathway in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 268(10): 7532-7537.
- Boer, R., Grassegger, A., Schudt, C. H. & Glossman, H. (1989). (+)-Niguldipine binds with very high affinity to Ca^{2+} channels and to a subtype of α_1 -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 172: 131-145.

- Bouvier, M., Leeb-Lundberg, L. M. F., Benovic, J. L., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. II. Effects of agonist occupancy on phosphorylation of α_1 - and β_2 -adrenergic receptors by protein kinase C and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 262: 3106-3113.
- Bruno, J. F., Whittaker, J., Song, J. & Berelowitz, M. (1991). Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding a human α_{1A} -adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179: 1485-1490.
- Burch, R. M., Luini, A. & Axelrod, J. (1986). Phospholipase A₂ and phospholipase C are activated by distinct GTP binding proteins in response to α_1 -adrenergic stimulation in FRTL-5 thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 7201-7205.
- Bylund, D. B. (1987). Biochemistry and pharmacology of the alpha-1 adrenergic receptor, in *The alpha-1 adrenergic receptors*. (Ruffolo, Jr. R. R. ed.), pp. 19-69. Humana Press. Clifton, New Jersey.
- Bylund, D. B. (1992). Subtypes of α_1 - and α_2 -adrenergic receptors. *FASEB J.* 6: 832-839.
- Bylund, D. B., Eikenberg, D. C., Hieble, P., Langer, S. Z., Lefkowitz, R. J., Minneman, K. P., Molinoff, P. B., Ruffolo, Jr., R. R. & Trendelenburg, U. (1994). IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46(2): 121-136.
- Cheng, Y. C. & Prusoff, W. H. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3099-3108.

- Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. & Kobilka, B. K. (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 -adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7159-7163.
- Crooke, S. T. & Bennett, C. F. (1989). Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C isoenzymes. *Cell Calcium.* 10: 309-323.
- Dixon, R. A. F., Sigal, I. S., Rands, E., Register, R. B., Candelore, M. R., Blake, A. D. & Strader, C. D. (1987). Ligand binding to the β -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature.* 326: 73-77.
- Dohlman, H. G., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987a). A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochem.* 26(10): 2657-2664.
- Dohlman, H. G., Bouvier, M., Benovic, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987b). The multiple membrane spanning topography of the beta 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 262: 14282-14288.
- Exton, J. H. (1981). Molecular mechanisms involved in α -adrenergic responses. *Mol Cell. Endocrinol.* 23: 233-264.
- Fabbi, E., Brighenti, L., Ottolenghi, C., Puviani, C. A. & Capuzzo, A. (1992). β -Adrenergic receptors in catfish liver membranes: characterization and coupling to adenylate Cyclase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 254-260.
- Fain, J. N. & Garcia-Sáinz, J. A. (1980). Role of phosphatidylinositol turnover in alpha₁ and of adenylate cyclase inhibition in alpha₂ effects of catecholamines. *Life Sciences.* 26: 1183-1194.

- Forray, C., Bard, J. A., Wetzel, J. M., Chiu, G., Shapiro, E., Tang, R., Lepor, H., Hartig, P. R., Weinshank, R. L., Branchek, T. A. & Gluchowski, C. (1994). The α_1 -adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human α_{1C} subtype. *Mol. Pharmacol.* 45: 703-708.
- García-Sáinz, J. A. & Fain, J. N. (1980). Effect of insulin, catecholamines and calcium ions on phospholipid metabolism in isolated white fat cells. *Biochem. J.* 186: 781-789.
- García-Sáinz, J. A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Baena, J., Tsujimoto, G. & Hoffman, B. B. (1985). Differential effects of adrenergic agonist and phorbol ester on the α_1 -adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 393-397.
- García-Sáinz, J. A. & Macías-Silva, M. (1990) Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172(2): 780-785.
- García-Sáinz, J. A., Casas-González, P., Romero-Avila, M. T. & González-Espinosa. (1994). Characterization of the hepatic α_{1B} -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sciences.* 54(25): 1995-2003.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcantara-Hernández, R., Macías-Silva, M., Olivares-Reyes, A. & González-Espinosa, C. (1992a). Species heterogeneity of hepatic α_1 -adrenoceptor: α_{1A} , α_{1B} and α_{1C} subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 760-767.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Olivares-Reyes, A.J. & Macías-Silva, M. (1992b). Guinea pig hepatocytes α_{1A} -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 227: 239-245.

- García-Sáinz, J. A. & Romero-Avila, M. T. (1993). Characterization of the α_{1A} -adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using 5-[3 H]methylurapidil. *Mol. Pharmacol.* 44: 589-594.
- García-Sáinz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcantara-Hernández, R. & 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.
- Gross, G., Hanft, G. & Rugevics, C. (1988). 5-methyl-urapidil discriminates between subtypes of the α_1 -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 151: 333-335.
- Gutiérrez-Venegas, G. & García-Sáinz, J. A. (1993). Characterization of the α_{1B} -adrenergic receptors of the chicken hepatocytes. Signal transduction and actions. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C(3): 797-803.
- Han, C., Abel, P. W., & Minneman, K., P. (1987a). Heterogeneity of α_1 -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine. *Mol. Pharmacol.* 31: 505-510.
- Han, C., Abel, P. W., & Minneman, K. P. (1987b). α_1 - Adrenoceptor subtypes linked to different mechanisms for increasing intracellular Ca^{2+} in smooth muscle. *Nature.* 329: 333-335.
- Hanft, G. & Gross, G. (1989). Subclassification of α_1 -adrenoceptor recognition sites by urapidil derivatives and other selective antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 97: 691-700.
- Henderson, R. & Unwin, P. N. T. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy *Nature.* 257: 28-32.
- Hepler, J. R., Kozasa, T., Smarcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C. & Gilman, A. G. (1993). Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant G_u and G_{12a} . *J. Biol. Chem.* 268: 14367-14375.

- Hoffmann, B. B. & Lefkowitz, R. J. (1991). Catecolaminas y drogas simpaticomiméticas en *Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S. & Taylor, P. eds.). pp. 196-227. Editorial Médica Panamericana. México, D. F.
- Hoffmann, B. B., Dukes, D. F. & Lefkowitz, R. J. (1981). Alpha adrenergic receptor subtypes in liver membranes: delineation with subtype selective radioligands. *Life Sci.* 28: 265-272.
- Hoffmann, B. B. & Lefkowitz, R. J. (1980). Radioligand binding studies of adrenergic adrenergic receptor: new insights into molecular and physiological regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 581-608.
- Janssens, P. A., Kleineke, J. & Caine, A. G. (1986). Calcium-independent stimulation of glycogenolysis by arginine vasotocin and catecholamines in liver of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Endocrinol.* 109: 75-84.
- Janssens, P. A. & Grigg, J. A. (1987). Hormonal regulation of hepatic glycogenolysis in the toad *Xenopus laevis*, is mediated by cyclic AMP and not Ca^{2+} . *Gen. Comp. Endocrinol.* 67: 227-233.
- Janssens, P. A. & Lowrey, P. (1987). Hormonal regulation of the hepatic glycogenolysis in the carp, *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol.* 525(Regulatory Integrative Comp. Physiol 21): R653-R660.
- Janssens, P. A. & Grigg, J. A. (1992). Hormones regulating hepatic glycogenolysis in two chelonians use cyclic AMP, and not Ca^{2+} , as intracellular messenger. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 117-127
- Janssens, P. A. & Grigg, J. A. (1988). Binding of adrenergic ligands to liver plasma membrane preparations from the axolotl, *Ambystoma mexicanum*; the toad *Xenopus laevis*; and the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 524-530.

- Johnson, R. D. & Minneman, K. P. (1987). Differentiation of α_1 -adrenergic receptors linked to phosphatidylinositol turnover and cyclic AMP accumulation in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 31: 239-246.
- Kebabian, J. W. & Neumeyer, J. L. Editors. (1994). The RBI handbook of receptor classification. *Research Biochemicals International*. Natick, MA. pag. 1-122.
- Kenny, B. A., Naylor, A. M., Greengrass, P. M., Russell, M. J., Friend, S. J., Read, A. M. & Wyllie, M. G. (1994). Pharmacological properties of the cloned α_{1AD} -adrenoceptor subtype are consistent with the α_{1A} -adrenoceptor characterized in rat cerebral cortex and vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 111: 1003-1008.
- Kleineke, J. & Janssens, P. (1993). Hormone-induced rise in cytosolic Ca^{2+} in axolotl hepatocytes: extracellular origin and control by cAMP. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.* 34): C1281-C1288.
- Kobilka, B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 15: 87-114.
- Kozasa, T., Hepler, J. R., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C. & Gilman, A. G. (1993). Purification and characterization of recombinant $G_{16\alpha}$ from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein α -subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9176-9180
- Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., DeBlasi, A., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1987). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. I. Agonist-promoted desensitization and phosphorylation of α_1 -adrenergic receptors coupled to inositol phospholipid metabolism in DDT₁ MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 262: 3098-3105.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1988). Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 4993-4996.
- Llahi, S. & Fain, J. (1992). α_1 -adrenergic receptor-mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 267(6): 3679-3685.
- Lomasney, J. W., Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Regan, J. W., DeBernardis, J. W., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. (1986). Mammalian α_1 -adrenergic receptor. Purification and characterization of the native receptor ligand binding subunit. *J. Biol. Chem.* 261: 7710-7716.
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1991a). Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochim. Biophys. Acta.* 1095: 127-139.
- Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W. Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1991b). Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1A} -adrenergic receptor: the gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem.* 266 (10). 6365-6369.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- McMillian, M. K., Schanberg, S. M. & Kuhn, C. M. Ontogeny of rat hepatic adrenoceptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227: 181-186.
- Michel, M. C., Hanft, G. & Gross, G. (1989). α_{1B} - but not α_{1A} -adrenoceptors mediate inositol phosphate generation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341: 385-387.

- Michell, R. H. (1975). Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim. Biophys. Acta.* 415: 81-147.
- Minneman, K. P., Hedberg, A. & Molinoff, P. B. (1979). Comparison of beta adrenergic subtypes in mammalian tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 502-508.
- Minneman, K. P. & Esbenshade, T. A. (1994). α_1 -Adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34: 117-133.
- Minneman, K. P., Han, C. & Abel, P. (1988). Comparison of α_1 -adrenergic receptor subtypes distinguished by chlorethylclonidine and WB 4101. *Mol. Pharmacol.* 33: 509-514.
- Minneman, K. P. (1988). α_1 -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.* 40: 87-119.
- Moon, T. W., Wals, P. J. & Mommsen, T. P. (1985). Fish hepatocytes: a model metabolic system. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 1772-1782.
- Moon, T.W., Capuzzo, A., Puviani, A. C., Ottolenghi, C. & Fabbri, E. (1993). α -Mediated changes in hepatocyte intracellular calcium in the catfish, *Ictalurus melas*. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab. 27): E735-E740.
- Morrow, A. L. & Creese, I. (1986). Characterization of α_1 -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3 H]-WB 4101 and [3 H]-prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* 29: 321-330.
- Neer, E. J. (1994). G Proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Prot. Sci.* 3: 3-14.
- Neville, Jr. D. M. (1968). Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 154: 540-542.

- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hidrólisis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 258: 607-614.
- Okseberg, D., Masters, S. A., O'Dowd, B. F., Jin, H., Havlik, S., Peroutka, S. J. & Ashkenazi, A. (1992). A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT_{1B} receptors. *Nature*. 360: 161-163
- Park, D., Jhon, D-Y., Lee, C-W., Ryu, S. H. & Rhee, S. G. (1993). Removal of the carboxyl-terminal region of phospholipase C- β 1 by calpain abolishes activation by G α_q . *J. Biol. Chem.* 268(5): 3710-3714.
- Perez, D. M., Piascik, M. T. & Graham, R. M. (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an α_{1D} -adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 40: 876-883.
- Price, D. T., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G., Berkowitz, D., Schwinn, D. A. (1994). Localization of mRNA for three distinct α_1 -adrenergic receptor subtypes in human tissues: Implications for human α -adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* 45: 171-175
- Ramarao, C. S., Kincade-Denker, J. M., Perez, D. M., Gaivin, R. J., Riek, R. P., Graham, R. M. (1992). Genomic organization and expression of the human α_{1D} -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 21936-21945.
- Rokosh, D. G., Bailey, B. A., Stewart, A. F. R., Karns, L. R., Long, C. S. & Simpson, P. C. (1994). Distribution of α_{1C} -adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with α_{1B} and α_{1D} . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200(3): 1177-1184.

- Sawutz, D. G., Lanier, S. M., Warren, C. D. & Graham, R. M. (1987). Glycosylation of the mammalian α_1 -adrenergic receptor by complex type N-linked oligosaccharides. *Mol. Pharmacol.* 32: 565-571.
- Schwinn, D. A. & 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.
- Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Fremeau, Jr. R. T., Yang-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Cotecchia, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 265 (14): 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. & Cotecchia, S. (1991). The α_{1C} -adrenergic receptor: Characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol. Pharmacol.* 40:619-626.
- Shorr, R. G., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1981). Purification of the β -adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. *J. Biol. Chem.* 256(11): 5820-5826.
- Shorr, R. G., Strohsacker, M. W., Lavin, T. N., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. (1982). The β -adrenergic receptor of turkey erythrocyte. Molecular heterogeneity revealed by purification and photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257(20): 12341-12350.
- Smrcka, A. W. & Sternweis, P. C. (1993). Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C β by G protein α and $\beta\gamma$ subunits. *J. Biol. Chem.* 268(13): 9667-9674.

- Staddon, J. M. & Hansford, R. G. (1986). 4β -phorbol 12-myristate 13-acetate attenuates the glucagon-induced increase in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 238: 737-743.
- Sternweis, P. C. (1994). The active role of $\beta\gamma$ in signal transduction. *Cur. Op. Cell Biol.* 6: 198-203.
- Strader, C. D., Sigal, I. S., Candelore, M. R., Rands, M. R., Hill, W. S. & Dixon, R. A. F. (1988). Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the β -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* 263(21): 10267-10271.
- Sulakhe, S. J., Pulga, V. P. & Tran, S. (1988). Hepatic α_1 and β adrenergic receptors in various animal species. *Mol. Cell Biochem.* 83: 81-88.
- Summers, R. J. & McMartin, R. (1993). Adrenoceptors and their second messenger systems. *J. Neurochem.* 60(1): 10-23.
- Suzuki, E., Tsujimoto, G., Tamura, K. & Hashimoto, K. (1990). Two pharmacologically distinct α_1 -adrenoceptors subtypes in the contraction of rabbit aorta: each subtype couples with a different Ca^{2+} signalling mechanism and plays a different physiological role. *Mol. Pharmacol.* 38: 725-736.
- Taddei, C., Poggesi, E., Leonardi, A. & Testa, R. (1993). Affinity of Different α_1 -agonists and antagonists for the α_1 -adrenoceptors of rabbit and rat liver membranes. *Life Sci.* 53: PL177-PL181.
- Torres-Márquez, M. E., Romero-Avila, M. T., González-Espinosa, C. & García-Sáinz, J. A. (1992). Characterization of rat white fat cell α_{1B} -adrenoceptors. *Mol. Pharmacol.* 42: 403-406.

- Torres-Márquez, M. E., Villalobos-Molina, R. & García-Sáinz, J. A. (1991). α_1 -Adrenoceptors subtypes in aorta (α_{1A}) and liver (α_{1B}). *Eur. J. Pharmacol.* 206: 199-202.
- Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, E. & Hashimoto, K. (1989). Glycogen phosphorylase activation by two different α_1 -adrenergic receptor subtypes: Methoxamine selectively stimulates a putative α_1 -adrenergic receptor subtype (α_{1A}) that couples with Ca^{2+} influx. *Mol. pharmacol.* 36: 166-176.
- Van Ermen, A., Van de Velde, E., Vanscheeuwijck, P. & Fraeyman, N. (1992). Influence of age on the β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in rat liver. *Mol. Pharmacol.* 42: 649-655.
- Wang, H., Lipfer, L., Malbon, C. C. & Bahouth, S. (1989). Site-directed anti-peptide antibodies define the topography of the β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 14424-14431.
- Woods, N. M., Cuthbertson, K. S. R. & Cobbold, P. H. (1986). Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature.* 319: 600-602
- Wu, D., Katz, A. & Simon, M. I. (1993). Activation of phospholipase C β_2 by the α and $\beta\gamma$ -subunits of trimeric GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 5297-5301.
- Wu, D., Katz, A., Lee, C-H. & Simon, M. I. (1992). Activation of phospholipase C by α_1 -adrenergic receptors is mediated by the α subunits of Gq family. *J. Biol. Chem.* 267(36): 25798-25802.
- Yang-Feng, T. L., Xue, F., Zhong, W., Cotecchia, S., Frielle, T., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. & Francke, U. (1990). Chromosomal organization of adrenergic receptor genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1516-1520.

- Zhang, J., Désilets, M. & Moon, T. W. (1992a). Evidence for the modulation of cell calcium by epinephrine in fish hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 263 (*Endocrinol. Metab.* 26): E512-E519.
- Zhang, J., Désilets, M. & Moon, T. W. (1992b). Adrenergic modulation of Ca^{2+} homeostasis in isolated fish hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 267-276.