

58
des



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DE RECEPTORES ALFA 1-
ADRENERGICOS EN HEPATOCITOS DE GATO**

T E S I S

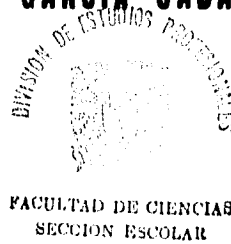
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
B I O L O G O

P R E S E N T A :
AGUSTIN GARCIA CABALLERO



MEXICO, D. F.

1995



FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Caracterización de receptores Alfa-adrenérgicos en hepatocitos de gato."

realizado por Agustín García Caballero

con número de cuenta 8724221-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. J. Adolfo García Sáinz

Propietario

Dra. Claudia González Espinosa

Propietario

Dra. Georgina Garza Ramos

Suplente

Dra. María Genoveva González Morán

Suplente

Dr. J. Manuel Pineda Cárdenas

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BILOGIA

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, con apoyo de la Dirección General de Asuntos para el Personal Académico DGAPA (IN200193), del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT (4711-109406) y de la Fundación UNAM.

*A mis padres, quienes me brindaron
incondicionalmente su amor y confianza,
además de los principios necesarios
para la realización de mis estudios.*

*A mi familia materna y paterna con
especial cariño.*

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz, quién dirigió eficazmente este trabajo, mi más sincero agradecimiento.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio cuyo apoyo y continua disposición facilitaron la realización de este trabajo, importante en la parte final de esta etapa de mi formación académica.

A mis compañeros de la facultad de ciencias por su amistad y consejos siempre oportunos.

A mis maestros, quienes brindaron su mayor esfuerzo y transmitieron su conocimiento sin recelo, mi más profundo agradecimiento.

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

I N D I C E

RESUMEN..... 1

INTRODUCCION..... 2

ANTECEDENTES.....29

OBJETIVO.....30

MATERIALES Y METODOS.....31

RESULTADOS.....35

DISCUSION.....37

CONCLUSION.....42

BIBLIOGRAFIA.....43

RESUMEN

La existencia de diversos tipos de receptores para las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, es actualmente mejor conocida. Es por ello que a estos receptores se les ha clasificado dentro de tres familias; los β , los α_1 y los α_2 adrenérgicos. Cada una de estas familias se divide a su vez en distintos subtipos de receptores. Así, de los receptores α_1 adrenérgicos se conocen en este momento tres subtipos; los α_{1A} , los α_{1B} y los α_{1D} . Se ha visto que la distribución de estos subtipos de receptores no es tejido-específica. Así, por ejemplo, el hígado de cuyo y el de conejo expresan el α_{1A} y el de rata, ratón, hamster y pollo expresan el α_{1B} .

En el presente trabajo se caracterizó farmacológicamente a los receptores α_1 adrenérgicos presentes en el hígado de gato, mediante estudios de asociación y competencia de ligandos. Con el uso de prazosina [H^3], un antagonista selectivo de los receptores α_1 adrenérgicos, se encontró que las membranas hepáticas de gato contienen un número pequeño de receptores α_1 (188 fmol/mg de proteína). Por otra parte en los experimentos de competencia de los diferentes ligandos por el receptor, se encontró el siguiente orden de potencia para los agonistas; Oximetazolina > Epinefrina = Norepinefrina > Metoxamina y para los antagonistas; WB4101 \geq Prazosina \geq Niguldipina \geq Benoxatian > 5 MU \geq Spiperona > Fentolamina. En las membranas tratadas con un antagonista de tipo irreversible, la cloroetilclonidina, se observó una disminución importante de hasta el 96 % en la unión específica de la prazosina [H^3].

Los resultados obtenidos sugieren la presencia predominante del subtipo α_{1A} adrenérgico en los hepatocitos del gato.

I N T R O D U C C I O N

La capacidad de comunicarse es una característica fundamental de las células. Las células de un organismo multicelular necesitan comunicarse una con otra para regular su desarrollo y organizarse en tejidos, así como para controlar su crecimiento y división. Y para coordinar sus funciones en general. El tipo de información que se maneja en la comunicación celular se puede agrupar en tres clases principales: genética, metabólica y nerviosa (1).

Este trabajo se centrará en el tipo de información metabólica la cual está contenida en las moléculas que participan en los procesos químicos mediante los cuales las células se reproducen, desarrollan y mantienen cierto equilibrio con su entorno extracelular.

Aquí el mecanismo general de comunicación empleado consiste en la liberación de una o varias moléculas por una célula secretora, la(s) cual(es) se dispersa(n) a través de los espacios intercelulares, hasta encontrar una célula receptora, en la que intervienen de manera muy específica en su metabolismo. Así hay por lo menos cuatro diferentes tipos de comunicación metabólica(2):

1. Comunicación endócrina u hormonal.

La palabra endócrina, del griego *endon*: dentro o interno y *krinein*: liberar, significa que las secreciones de las glándulas son internas, esto es, que son liberadas al torrente sanguíneo y no al exterior del organismo. Por otra parte la palabra hormona se deriva del verbo griego *hormon*, que significa "excitar", este término fue acuñado por Henry Starling en 1905 (3).

En este tipo de comunicación, las células de las glándulas de secreción interna (como la hipófisis, la tiroides, los islotes del páncreas, las suprarrenales, los ovarios y los testículos), vierten su mensajero, es decir, liberan las hormonas al torrente circulatorio. Una vez en la sangre, éstas circulan por todo el organismo: sin embargo solamente interaccionan con algunas células que son receptoras para un mensajero dado, las cuales se llaman células blanco. Esto indica que el mensajero es selectivo, es decir, que va dirigido únicamente a ciertas células.

2. Comunicación por secreción neuroendócrina o neurosecreción.

En este caso, una célula formada a partir de tejido nervioso secreta un mensaje en forma de neurotransmisor a la circulación. La neurohormona viaja en el torrente sanguíneo para interaccionar con células receptoras o "blanco".

3. Comunicación parácrina.

Esta comunicación tiene un carácter netamente local, es decir, se produce entre células cercanas, que funcionan respectivamente como secretoras y blanco, sin que para ello exista una estructura especializada. Es un proceso sencillo, local, en el que intervienen las llamadas hormonas locales o mediadores locales, denominados también autacoides (termino que proviene del griego autos:propia y akos: remedio, y que pretende dar la idea de que son sustancias que se producen en el mismo organismo, para su propia curación o alivio). Tales mediadores locales o autacoides actúan en células del

entorno inmediato y generalmente no entran al torrente sanguíneo en cantidades significativas ya que son rápidamente destruidas por enzimas extracelulares o inmobilizadas en la matriz extracelular.

4. Comunicación autócrina o autocomunicación.

Consiste en que una célula se comunica con ella misma, es decir, la célula es secretora y blanco. En este tipo de comunicación los autacoides o sustancias que actúan localmente proveen gran parte de la terapia de drogas, que se utilizan hoy en día, ya que están claramente relacionados con algunos fenómenos fisiológicos y patológicos. Así, la bradikina y la histamina son ejemplos de este tipo de sustancias cuya existencia provee numerosas posibilidades para la intervención terapéutica mediante el uso de drogas que mimetizan o antagonizan sus acciones o interfieren con su síntesis o metabolismo. La histamina, por ejemplo, juega un papel importante en la hipersensibilidad inmediata y en las respuestas alérgicas mediante sus acciones en músculo liso bronquial y en vasos sanguíneos. Además algunas drogas útiles en la clínica pueden actuar directamente en las células cebadas para liberar a la histamina.

Las señales endócrinas son relativamente lentas ya que se basan en la difusión y en el flujo sanguíneo; usualmente una hormona se tarda varios minutos en alcanzar las células blanco después de haber sido secretada. De hecho la especificidad de la señal en el sistema endócrino depende completamente de la química del mensajero, del tipo de receptores en la célula blanco y de la maquinaria interna a la cual están acoplados. Cada tipo celular tiene su propia

combinación de receptores, así la misma hormona se puede unir a diferentes receptores, como en el caso de la epinefrina y norepinefrina, las cuales se pueden unir a los receptores β y α -adrenérgicos. Dos tipos celulares con el mismo receptor pueden estar acoplados a distintos sistemas de transducción y por tanto pueden responder de manera diferente a la misma hormona.

Las hormonas están muy diluídas en el torrente sanguíneo y fluido intersticial y por ello actúan a muy bajas concentraciones (de 10^{-6} M a 10^{-12} M, es decir del orden micromolar al picomolar), por ejemplo el nivel normal de epinefrina en la sangre es de sólo 10^{-10} M aunque la concentración de ésta en la sangre aumenta hasta 1,000 veces en pocos segundos o minutos en respuesta a un estímulo sensorial.

Hay tres clases químicas distintas de hormonas: peptídicas, aminas y esteroideas.

Las hormonas **peptídicas**, las cuales pueden tener de 3 a más de 200 residuos de aminoácidos, incluyen a todas las hormonas liberadas por el hipotálamo (como la hormona liberadora de tiotropina), la glándula pituitaria (corticotropina y vasopresina) y las hormonas pancreáticas; la insulina, glucágon y somatostatina.

Las hormonas con grupo amino o **aminas** biogénicas, compuestos de bajo peso molecular derivados del aminoácido tirosina, incluyen a la epinefrina y norepinefrina, solubles en agua, liberadas por la médula adrenal y a las hormonas tiroideas, insolubles en agua. Epinefrina fue el nombre asignado por Abel en 1899 al principio activo encargado del efecto depresor en los extractos suprarenales demostrado por vez primera por Oliver y Schäfer en 1895. Barger y Dale (1910) estudiaron la actividad farmacológica de varias aminas sintéticas relacionadas con la epinefrina y denominaron a estas acciones "simpatomiméticas", debido a que simulaban o producían efectos en el sistema nervioso simpático, el cual participa de manera importante en la

regulación homeostática mediante una amplia variedad de funciones, entre las cuales se encuentran; el ritmo y fuerza de contracción cardíacos, el tono vasomotor, la presión sanguínea, el tono de las vías respiratorias bronquiales y el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos grasos(4).

La estimulación del sistema nervioso simpático ocurre normalmente en respuesta a una actividad física, a estrés psicológico, a reacciones alérgicas generalizadas, entre otras situaciones en las que el organismo es estimulado. Las respuestas fisiológicas y metabólicas producidas a causa de la estimulación de los nervios simpáticos en los mamíferos son generalmente mediadas por el neurotransmisor, norepinefrina (Tabla I). Como parte de la respuesta al estrés, la médula suprarrenal también es estimulada, lo que eleva la producción y liberación de la epinefrina y norepinefrina en la circulación sanguínea.

Existen muchos tipos de drogas simpatomiméticas que tienen efectos profundos en la fisiología de órganos inervados simpáticamente. La mayoría de estas drogas son importantes en la medicina clínica particularmente en las enfermedades cardiovasculares.

Las hormonas **esteroides**, las cuales son liposolubles, incluyen a las hormonas derivadas de la corteza adrenal, a la vitamina D, y a los andrógenos y estrógenos, hormonas sexuales masculinas y femeninas respectivamente. Los **eicosanoides** son derivados del ácido graso polinsaturado de 20 carbonos, llamado ácido araquidónico. Las tres subclases de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), son inestables e insolubles en agua, estas moléculas generalmente no viajan muy lejos del tejido que las produce, por lo que actúan principalmente en células cercanas al punto de liberación (3).

También las moléculas señal o mensajeros, se pueden clasificar de acuerdo a su solubilidad en el agua. Las moléculas hidrofóbicas pequeñas, como las hormonas

TABLA I
EFFECTOS METABOLICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA EPINEFRINA

| EFFECTOS INMEDIATOS DE LA EPINEFRINA | EFFECTOS FINALES DE LA EPINEFRINA |
|--|---|
| <p>1. Fisiológicos Incremento del ritmo cardíaco Incremento de la presión sanguínea Incremento en la dilatación de las vías respiratorias</p> <p>2. Metabólicos Incremento en el rompimiento del glucógeno (músculo e hígado) Decremento en la síntesis del glucógeno (músculo e hígado) Incremento en la gluconeogénesis (hígado)</p> <p>Incremento de la glucólisis (músculo)</p> <p>Incremento en la movilización de los ácidos grasos (tejido adiposo)</p> <p>Incremento en la secreción de glucagon Decremento en la secreción de insulina</p> | <p>1. Fisiológico Incremento de O₂ en los tejidos (músculo)</p> <p>2. Metabólicos Incremento en la producción de glucosa como combustible</p> <p>Incremento en la producción de ATP en músculo</p> <p>Incremento en la disponibilidad de los ácidos grasos como combustibles</p> <p>Potenciación de los efectos metabólicos anteriores</p> |

Tomada del Lehninger et al, 1993 (3).

esteroideas y tiroideas, pasan a través de la membrana plasmática de la célula blanco y activan a proteínas receptoras dentro de ésta. Por otra parte las moléculas hidrofílicas, incluso a todos los neurotransmisores, a la gran mayoría de hormonas y mediadores químicos locales, activan a las proteínas receptoras localizadas en la superficie de las células blanco. Estas proteínas receptoras se unen a la molécula señal (ligando) con alta afinidad y convierten este acontecimiento extracelular en una o más señales intracelulares, que alteran el metabolismo de la célula blanco.

La mayoría de las proteínas receptoras que se encuentran en la superficie celular pertenecen a una de las siguientes tres clases, las cuales están definidas por el mecanismo de transducción que utilizan (5):

- **Receptores-canal;** son canales iónicos que participan principalmente en la señal sináptica rápida entre células excitables eléctricamente. Este tipo de señal está mediada por un pequeño número de neurotransmisores, los cuales abren o cierran el canal iónico al cual están unidos, así cambian la permeabilidad iónica de la membrana plasmática (5).
- **Receptores con actividad enzimática;** cuando son activados por su ligando, operan directamente como enzimas. La mayoría de los receptores catalíticos conocidos son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y funcionan como proteínas con actividad de tirosina-cinasa, de serina y treonina cinasas, de guanilato ciclasa y fosfatasas (5).
- **Receptores acoplados a proteínas G;** estos receptores activan o inactivan indirectamente una enzima o canal iónico separados espacialmente del propio receptor. La interacción entre el receptor y la enzima o canal iónico

está mediada por una tercera proteína, llamada proteína G o proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina (Fig 1). Este tipo de receptores generalmente activan una cadena de fenómenos que alteran la concentración de una o más moléculas pequeñas de señal intracelular, referidas con frecuencia como mensajeros intracelulares o segundos mensajeros. Estos mensajeros intracelulares actúan a su vez, por medio de la alteración del comportamiento de otras proteínas blanco en la célula. Dos de los más importantes mensajeros intracelulares son: el AMP cíclico (AMP_c) y el ión Ca²⁺. Ambas señales son generadas por diferentes rutas, que incluyen a proteínas G, y son utilizadas por casi todas las células animales.

Cabe mencionar como ejemplo a los receptores α_1 -adrenérgicos, los cuales a través de las proteínas G median dos funciones principalmente: unen a los ligandos u hormonas endógenas del exterior celular, de tal manera que el receptor se puede encontrar en dos estados distintos de afinidad, según la asociación de éste con la proteína G (Fig 1) y activan un sistema efector (recambio de fosfoinosítidos-calcio), que genera segundos mensajeros intracelulares (IP₃ y Ca²⁺), los cuales son capaces de activar varios procesos bioquímicos.

BOSQUEJO HISTORICO - RECEPTORES ADRENERGICOS

En la segunda mitad del siglo XIX algunos farmacólogos como Thomas Fraser y Thomas Lauder, especularon que la acción fisiológica de las drogas se debía a una reacción química entre la droga y algún constituyente celular. No fue sino hasta el trabajo experimental de Langley, con pilocarpina en 1874, que se dió alguna evidencia farmacológica de ello. En un artículo publicado en 1878 Langley comenta que hay una o varias substancias en las terminales nerviosas o células glandulares con las cuales la

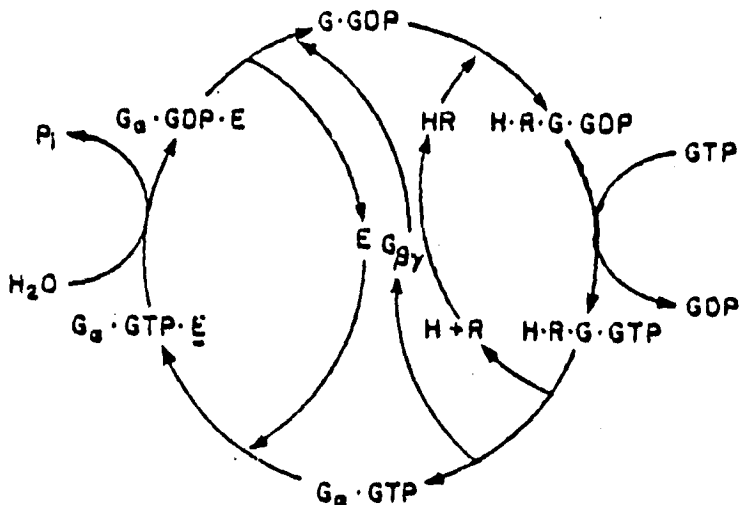


FIGURA 1

Interacción del receptor R, hormona E, proteína G, GTP, GDP y efector E.

La interacción HR estimula la disociación de G.GDP, tal disociación debe de ser precedida por la unión de GTP, es decir la interacción HR permite el intercambio de GDP por GTP en el sitio de unión al nucleótido de guanina en la proteína G, de esta manera la proteína G es activada y se disocia el dímero $\beta\gamma$ de la subunidad $G\alpha$.GTP, por lo cual la proteína G ya no está asociada al receptor R, éste queda R+H en un estado de baja afinidad, y no en un estado de alta afinidad H.R.G. (R.G asociados). Una vez activada la proteína G; $G\alpha$.GTP, ésta interacciona con la molécula efectora $G\alpha$.GTP.E, posteriormente a la activación de E, la actividad GTPásica de la proteína G permite la hidrólisis de GTP a GDP, se disocia así la forma $G\alpha$.GDP del efector E, y la proteína G.GDP queda en estado inactivo y preparada para poder pasar a un estado activo en respuesta a la interacción hormona-receptor H-R.

Tomada de Gilman 1987 (6).

atropina y pilocarpina son capaces de formar compuestos (7). Más tarde en 1897 Ehrlich utiliza el concepto primitivo de receptor ("side chain concept"), para explicar la neutralización de toxinas bacterianas por anticuerpos. Con base en sus experimentos inmunológicos Ehrlich argumentaba que la habilidad de la toxina de combinarse con la antitoxina, se debía a que la primera, presentaba un grupo particular de átomos con afinidad específica por otro grupo de átomos en la antitoxina. Ehrlich también distinguió a los grupos toxóforo y haptóforo en la toxina y consideró que el primero daba la actividad tóxica mientras que el segundo fijaba la droga a la célula y permitía al grupo toxóforo ejercer su acción (8).

Posteriormente en un artículo publicado en 1905, Langley concluye con base en sus experimentos, que algunos compuestos eran capaces de ejercer una acción directa sobre las células musculares, ya sea al estimular directamente a las células o al antagonizar este efecto con nicotina y curare respectivamente. Langley argumentaba que ambas drogas debían competir por la misma "substancia receptiva", así sugirió el mismo comportamiento para muchas otras drogas y venenos. Incluso generalizaba en la existencia de distintos tipos de sustancias receptoras presentes en diferentes células y mencionaba que este concepto iba en favor de la línea de pensamiento de Ehrlich y su teoría de la inmunidad (9).

En junio de 1907 Ehrlich distingue a los quimiorreceptores de los receptores a toxinas y seis años más tarde reafirma esta distinción con las investigaciones de Langley sobre los efectos de los alcaloides (8).

No fue sino hasta la década de 1950 que los conceptos proporcionados por Ehrlich y Langley se convirtieron en una mayor área de interés experimental en farmacología.

Así a mediados del siglo XX, mediante el estudio de la interacción de hormonas y drogas con sus respectivos blancos, se tenía claro que los receptores juegan un papel

central en la interacción de ligandos (drogas) con las células y era necesario el tratar de entender mejor las bases moleculares de sus acciones, así como los mecanismos precisos que se presentan particularmente en los estados patofisiológicos. Debido a los mecanismos efectores o a la variedad de funciones bien definidas de los receptores adrenérgicos y a su diversa distribución en los tejidos, dichos receptores han sido un buen modelo para el estudio de estos procesos. Es por ello que se intentó subclasificar por primera vez o distinguir al menos cualitativamente a los subtipos de receptores adrenérgicos mediante los efectos de aminas simpatomiméticas, simpatina E y simpatina I, las cuales mediaban excitación o inhibición respectivamente (10).

Por otra parte Ahlquist en 1948 (11), propuso la existencia de dos subtipos de receptores adrenérgicos, basada en los diferentes órdenes de potencia de una serie de agonistas sintéticos evaluados en distintos tejidos. A estos subtipos los llamó receptores α y β adrenérgicos, los cuales podían tener efectos inhibidores o excitadores, según el tejido en cuestión. Así Ahlquist consideró que todas las respuestas adrenérgicas eran controladas por uno u otro de estos receptores y algunas de las respuestas clínicas importantes las asignó a ambos receptores de la siguiente manera:

- El receptor alfa adrenérgico está asociado con la contracción del músculo involuntario (liso). Los vasos sanguíneos son contraídos; el músculo radial del iris es contraído; el útero y vaso son contraídos. El músculo liso del tracto intestinal es relajado.
- El receptor beta adrenérgico está asociado a la relajación o inhibición de la actividad del músculo liso. Los vasos sanguíneos son dilatados; el músculo liso bronquial es relajado; la actividad intestinal es

inhibida. El corazón es estimulado, por lo cual hay un incremento en el ritmo cardíaco, la fuerza de contracción y la velocidad del impulso cardíaco.

En 1957 se reafirmó la subclasificación hecha por Ahlquist con la descripción del agonista parcial Dicloroisoprenalina (DCI), el primer agente capaz de bloquear las respuestas mediadas por los receptores β y no la de los receptores α , este agente fue preparado por vez primera por Powell y Slater (12).

Más tarde en 1967, de una manera muy similar a la de Ahlquist, Lands y colaboradores (13), comparan los órdenes de potencia de varios agonistas, y concluyen en la existencia de dos subtipos de receptores β adrenérgicos. El β_1 -adrenérgico, receptor dominante en el tejido adiposo y cardíaco, era igualmente sensible a la noradrenalina y adrenalina, mientras que el receptor β_2 -adrenérgico, responsable de la relajación del músculo liso vascular, uterino y de los bronquios, era mucho menos sensible a la noradrenalina que a la adrenalina.

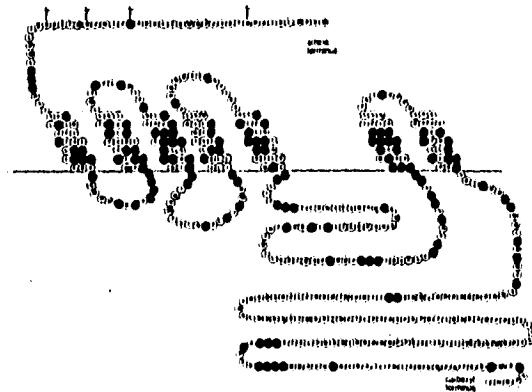
En 1977 Langer (14), con base en la localización anatómica, sugiere la nomenclatura de α_2 y de α_1 para los receptores adrenérgicos pre y postsinápticos respectivamente. Sin embargo debido a que algunos receptores localizados postsinápticamente tenían ya sea una función inhibitoria o excitatoria, Berthelsen y Pettinger en 1977 (15), consideran más apropiado clasificar a estos receptores de acuerdo a su función, así se atribuye una función inhibitoria a los α_2 y una excitatoria a los α_1 . Posteriormente son los estudios basados en las interacciones de agonistas y antagonistas más potentes y altamente selectivos, los que dan la pauta para subclasificar a los receptores alfa, con base en un criterio farmacológico en contra posición de subdivisiones funcionales o anatómicas propuestas previamente.

TOPOGRAFIA DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS

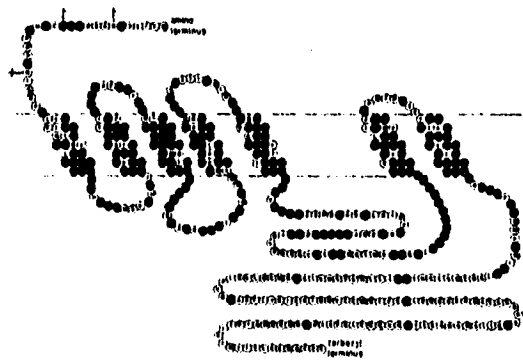
La estructura primaria de este tipo de receptores sugiere que son proteínas integrales de membrana. Estos receptores consisten de una sola subunidad, la cual esta constituida por siete dominios transmembranales de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos. En estos dominios transmembranales los receptores adrenérgicos poseen un alto grado de identidad en su secuencia de aminoácidos, lo cual se puede ver entre miembros o subtipos de la misma subfamilia. El extremo amino terminal, que se localiza en la región extracelular, la tercera asa citoplásmica y el extremo carboxilo terminal intracelular, son las regiones de mayor diversidad entre los subtipos. Los sitios de N-glucosilación extracelular, cerca del extremo amino, así como varios sitios potenciales de fosforilación regulatoria en los dominios citoplásmicos, son regiones compartidas entre los receptores adrenérgicos (Fig 2).

Los dominios extracelulares de los receptores acoplados a las proteínas G, contienen 3 asas que conectan las 7 α -hélices hidrofóbicas transmembranales, así como el amino terminal glucosilado. La función de los residuos glucosilo ligados a la asparagina del extremo amino no se conoce aún, sin embargo varios estudios han demostrado que no son esenciales en la unión del ligando (16 y 17). Las asas extracelulares contienen varios residuos de cisteína los cuales al interaccionar forman uniones disulfuro, que pueden estabilizar la unión del ligando al receptor. Estos residuos se encuentran conservados en muchos de los receptores acoplados a las proteínas G.

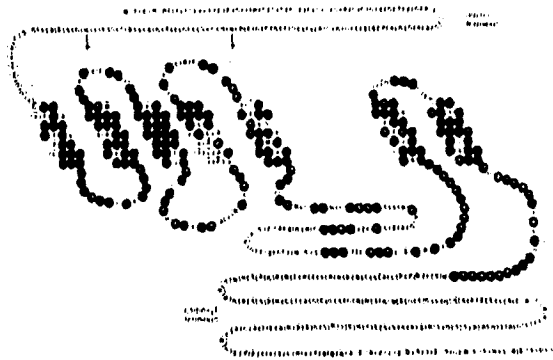
Los dominios citoplásmicos de los receptores adrenérgicos y receptores semejantes, consisten de 3 asas intracelulares y una parte carboxilo terminal. Estas regiones participan en diferentes funciones, que incluye el acoplamiento a las proteínas G, así como varias modificaciones covalentes. Las primeras dos asas



Receptor α_{1B} -adrenérgico



Receptor α_{1C} -adrenérgico



Receptor α_{1D} -adrenérgico

FIGURA 2

Estructura Molecular de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos. (Tomados de Schwinn, et al, 1990; Lomasney, et al, 1991a, y Lomasney, et al, 1991b) (18,19 y 20). Los círculos oscuros indican los residuos de aminoácidos idénticos a los del receptor α_{1B} -adrenérgico de rata.

citoplásmicas son las regiones más conservadas entre los receptores acoplados a las proteínas G.

Varios estudios sugieren que las regiones en la tercera asa citoplásmica del receptor β_2 -adrenérgico son fundamentales en el acoplamiento con la proteína G. Se ha propuesto que la palmitoilación de estos receptores y quizá de otros acoplados a proteínas G, pueden anclar esta región del receptor a la membrana plasmática, lo que permite una conformación adecuada para la asociación de la proteína G. Algunos datos obtenidos por estudios de mutagénesis dirigida, así como de receptores quiméricos, apoyan la hipótesis de que las regiones de la tercera asa citoplásmica y el extremo carboxilo, participan en el acoplamiento de la proteína G con el receptor. Estos dominios citoplásmicos también pueden intervenir en fenómenos de regulación, como la endocitosis de los receptores, "down regulation" y la desensibilización vía modificación covalente .

RECEPTORES β ADRENERGICOS.

Generalmente se acepta la existencia de dos subtipos de receptores β (13) los β_1 y los β_2 . Sin embargo se han acumulado evidencias, a través de los años, de que existe un receptor β que es insensible a los antagonistas comúnmente usados, a este receptor generalmente se le refiere como el receptor β adrenérgico atípico, pero con la identificación de agonistas selectivos y la expresión del receptor recombinante, ya es apropiado el referirse a este receptor como el receptor β_3 adrenérgico.

Los tres subtipos de receptores β pueden ser activados por la noradrenalina y la adrenalina. Sin embargo, en contraste con los receptores α adrenérgicos, las catecolaminas endógenas presentan diferente afinidad por los receptores β adrenérgicos. Así se puede hacer una distinción primordial entre los subtipos β_1 y β_2 pues este

último tiene una selectividad 100 veces mayor por la adrenalina que por la noradrenalina, mientras que para el β_1 ambas catecolaminas son equipotentes. Por otra parte el antagonista propranolol y muchos de sus análogos son más potentes para los receptores β_1 y β_2 que para los β_3 (Tabla II).

Se han identificado antagonistas selectivos para los receptores β_1 (e.g. metoprolol, practolol, atenolol, betaxolol, CGP 20712A (21)) para los β_2 (butoxamina, ICI 118,551 (22)) y para los β_3 no se ha identificado ningún antagonista selectivo hasta la fecha, aunque se ha visto que el antagonista β_2 ICI 118,551 inhibe la estimulación de la adenilato ciclasa mediada por el receptor β_3 , cuando éste es expresado en células. Pero el receptor β_3 es insensible a la mayoría de los antagonistas β adrenérgicos (Tabla II).

Hoy en día también hay agonistas sintéticos selectivos para los tres diferentes subtipos. Para el subtipo β_1 (e.g. denopamina, Ro 363 y xamoterol), los agonistas que se han identificado no son muy eficaces y/o selectivos, para el subtipo β_2 (e.g. terbutalina, salbutamol, salmeterol y zinterol), los agonistas identificados son altamente selectivos y para el β_3 se ha visto que los compuestos; BRL 37344, ICI 198,157, CL 316,243 y CGP12177, activan selectivamente a este receptor. Este último es un agonista parcial para el receptor β_3 (23 y 24) y un antagonista para los subtipos β_1 y β_2 .

Por otra parte en cuanto a los efectos fisiológicos se conoce que los receptores β_1 regulan los incrementos en el ritmo cardíaco y fuerza de contracción, estimulan la secreción de renina, la relajación de las arterias coronarias y relajación del músculo liso gastrointestinal. De igual manera los receptores β_2 regulan la relajación del músculo liso en muchos sitios, que incluye las vías respiratorias, la mayoría de los vasos sanguíneos y el útero. Así las principales acciones que regulan los receptores β_3 son: la lipólisis en el tejido adiposo blanco

TABLA II
FAMILIA DE RECEPTORES ADRENERGICOS.

| COMPUESTO Ki (nM) | α_{1A} | α_{1B} | α_{1D} | |
|---|---|------------------|------------------------------|---------------|
| WB4101 | 0.51 - 0.87 | 8.0 ± 2.8 | 1.6 ± 0.3 | |
| 5-Metilurapidil | 2.3 - 5.75 | 96 ± 26 | 15 ± 0.4 | |
| Prazosina | 1.15 - 2.07 | 0.32 ± 0.09 | 0.32 ± 0.01 | |
| Oximetazolina | 4 - 8 | 280 ± 56 | 2140 | |
| Spiperona | 7.2 - 22 | 1.3 ± 0.72 | | |
| Cloroetilclonidina | 0 / ++ / +++ | +++ | ++ | |
| NUMERO DE AMINOACIDOS | (466) | 515 | 560 | |
| UBICACION EN CROMOSOMA | (8) | 5q32-q34 | 20p13 | |
| DISTRIBUCION | Vasos deferentes, Cerebro (Bulbo Olfatorio) | Hígado, Cerebro | Vasos deferentes, Cerebro | |
| COMPUESTO Ki (nM) | α_{2A} ? | α_{2B} ? | α_{2C} | α_{2D} |
| Rauwolfscina | 3.7 ± 1.6 | 33 ± 10 | 1.2 ± 0.5 | 0.18 ± 0.03 |
| Prazosina | 1034 ± 403 | 1127 ± 337 | 30 ± 7 | 61 ± 17 |
| ARC-239 | 256 ± 86 | 285 ± 135 | 4.6 ± 2.0 | 51 ± 28 |
| BAM-1303 | 4.8 ± 1 | 70 ± 16 | 21 ± 12 | 0.73 ± 0.37 |
| BRL 44408 | 3.6 ± 1.9 | 16 | 174 ± 30 | 187 |
| Oximetazolina | 5.6 ± 1.9 | 34 ± 14 | 350 ± 91 | 72 ± 23 |
| Imiloxan | 1750 ± 1250 | 79 | 50 ± 6 | |
| NUMERO DE AMINOACIDOS | 450 | | 450 | 461 |
| UBICACION EN CROMOSOMA | 10q24-q26 | | 2 | 4 |
| DISTRIBUCION | Aorta, Cerebro | | Hígado, Riñon | Cerebro |
| COMPUESTO Ki (nM) | β_1 | β_2 | β_3 | |
| Isoprenalina | 14 | 21 | | |
| Xamoterol | 135 | 4533 | | |
| Salbutamol EC ₅₀ | 810 | 26 | 2300 | |
| Salmeterol EC ₅₀ | > 30,000 | 4 | | |
| BRL37344 EC ₅₀ | 680 | 35 | 1.7 | |
| CGP12177 K _{act} | | | 300 | |
| Propranolol K _B | 1 | 0.7 | 95 | |
| Metoprolol | 3 | 4200 | | |
| Bisoprolol | 0.2 | 1020 | | |
| ICI118551 | 710 | 4.6 | | |
| NUMERO DE AMINOACIDOS | 477 | 413 | 402 | |
| UBICACION EN CROMOSOMA | 10q24-q26 | 5q31-q33 | | |
| DISTRIBUCION | Corazón, Pineal | Pulmón, Próstata | Tejido Adiposo | |

(Tomada y Modificada de Bylund et al, 1994 (47) y García-Sáinz et al, 1995 (74).)

y la termogénesis en el tejido adiposo pardo, y hay evidencia de que este subtipo contribuye en la estimulación de la secreción de insulina de las células de los islotes pancreáticos, en la inhibición de la síntesis de glucógeno en el músculo esquelético y en la inhibición de la actividad contráctil del músculo liso gastrointestinal.

Subtipos Recombinantes.

Todos los receptores β identificados farmacológicamente han sido recombinados y expresados. El ADNC de los receptores β_1 y los β_2 ha sido obtenido de una variedad distinta de tejidos del pavo, hamster, ratón, rata y humano. El receptor β_3 de humano ha sido recombinado recientemente. Las características farmacológicas de los receptores recombinantes, parecen corresponder bien con las obtenidas de los tres subtipos de receptor identificados inicialmente, aunque hay algunas diferencias para el caso del receptor β_3 .

Sistema de Transducción.

Los tres subtipos β_1 , β_2 y β_3 parecen estar acoplados al sistema de la adenilato ciclasa por medio de una proteína G estimuladora o G_s y no hay evidencia de alguna diferencia en la interacción receptor-proteína G-ciclasa entre los subtipos (25). Hay evidencia para sugerir que en ciertos tejidos, como el músculo cardíaco, podría haber un acoplamiento directo entre una proteína G estimuladora y un canal de Calcio sensible a voltaje (26) (Fig 3).

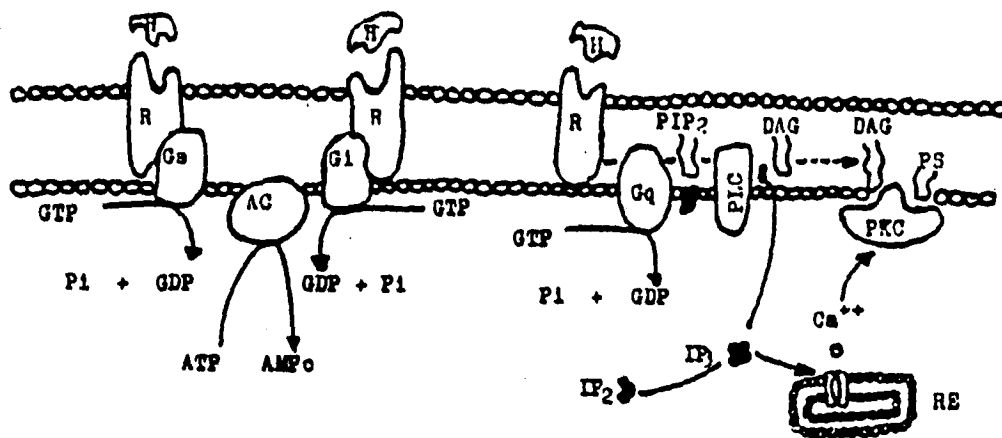


FIGURA 3

Modelo del sistema de transducción de la adenilato ciclasa y de los fosfoinosítidos-calcio.

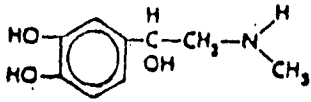
H, hormona; R, receptor; Gs, proteína G estimuladora; Gi, proteína G inhibitoria; Gq, proteína G; AC, adenilato ciclasa; PLC, fosfolipasa C; PIP₂, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; IP₃, inositol 1,4,5 trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C; PS, fosfatidilserina; RE, retículo endoplasmático; GTP, trifosfato de guanosina; GDP, difosfato de guanosina; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclica.

RECEPTORES α_1 ADRENERGICOS.

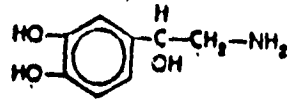
En lo que respecta a los receptores α_1 , es evidente la existencia de varios subtipos en los diferentes tejidos estudiados hasta la fecha, además de los ya descritos por Langer y sus colaboradores hace algunos años.

Todos los subtipos α_1 -adrenérgicos son activados por los neurotransmisores simpáticos, noradrenalina y adrenalina (Fig 4). No hay evidencia de afinidad selectiva por alguna de estas catecolaminas para los subtipos identificados hasta la fecha. Todas las respuestas mediadas por los α_1 son bloqueadas por la prazosina y todos los subtipos muestran baja afinidad por los antagonistas selectivos a receptores α_2 -adrenérgicos como la yohimbina o rauwolscina. Todos los subtipos conocidos pueden ser marcados con la prazosina[H^3] (Fig 4) o [I^{125}]IBE-2254 (I-HEAT) y su activación está asociada con un incremento en el calcio intracelular.

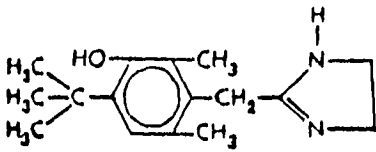
La subdivisión inicial de los receptores α_1 -adrenérgicos en los subtipos α_{1A} y α_{1B} , se realizó con base en la afinidad de éstos por la fentolamina y el WB4101 (27). Esta clasificación en los subtipos α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos, ha sido apoyada por la identificación de muchos antagonistas (Fig. 4 y Tabla II), los cuales muestran una selectividad de al menos 100 veces más por el α_{1A} , como en el caso de el 5-metilurapidil (28) y la (+)niguldipina (29), y mediante el descubrimiento del agente alquilante cloroetilclonidina, el cual presenta diferente selectividad por el subtipo α_{1B} y el α_{1A} (30). Actualmente no hay un antagonista selectivo por el α_{1B} , aunque la spiperona ha sido reportada con un rango de afinidad de 10 veces mayor por el α_{1B} que el α_{1A} adrenérgico (31). Así los receptores α_1 adrenérgicos están actualmente clasificados como α_{1A} o α_{1B} , con base en las constantes de disociación del receptor por el 5 metilurapidil o (+)niguldipina y en la sensibilidad a la inactivación irreversible por la cloroetilclonidina (Tabla II).



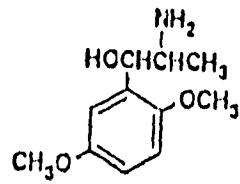
Epinefrina



Norepinefrina



Oximetazolina

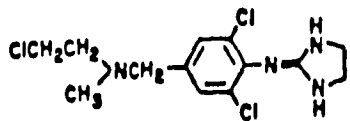


Metoxamina

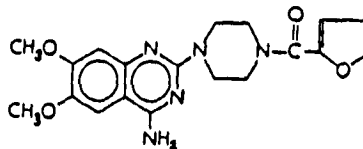
A G O N I S T A S

FIGURA 4

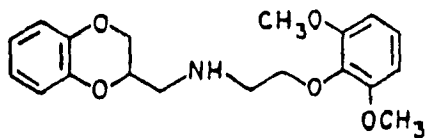
Estructura química de agonistas y antagonistas α_1 adrenérgicos.



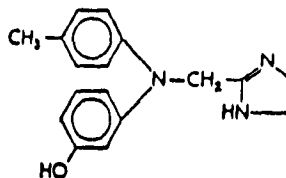
Cloroetilclonidina (CEC)



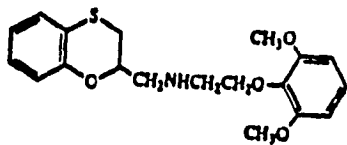
Prazosina



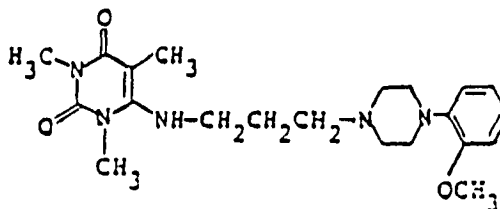
WB 4101



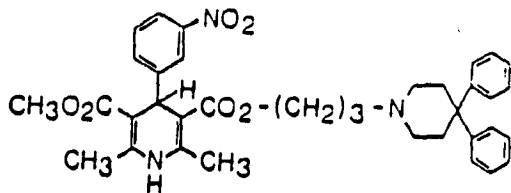
Fentolamina



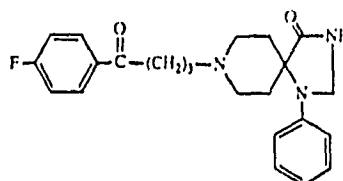
Benoxatian



5-metil urapidil



(+)Niguldipina.



Spiperona

A N T A G O N I S T A S

Los resultados de algunos estudios funcionales y de asociación de radioligandos, sugieren que el vaso deferente de la rata contiene una alta densidad de receptores α_{1A} adrenérgicos en comparación a el α_{1B} .

En otros tejidos como en el anococcígeo y en el de la glándula submaxilar de rata predomina el subtipo α_{1A} . Por otro lado las respuestas α_1 adrenérgicas del bazo e hígado de rata son mediadas principalmente por el subtipo α_{1B} .

La mayoría de los tejidos estudiados, como la corteza cerebral, hipocampo, corazón y riñón de rata, contienen poblaciones mezcladas de los dos subtipos (30).

Además de la clasificación antes descrita Flavahan y Vanhoutte (1986) diferenciaron a los receptores α_1 adrenérgicos en dos grupos, designados α_{1H} y α_{1L} , con alta y baja afinidad por la prazosina y yohimbina respectivamente. Esta subclasificación ha sido recientemente extendida al agregarse un tercer grupo, α_{1N} , el cual presenta una relativamente baja afinidad por la prazosina y una afinidad más alta que la esperada por la yohimbina (32).

Se ha postulado que los receptores α_{1A} y α_{1B} forman parte del subtipo α_{1H} (33).

Subtipo α_{1A} adrenérgico.

Se ha comprobado la existencia de este receptor con estudios de tipo farmacológico, sin embargo no se ha podido aislar ningún ADNC que contenga a este receptor. Es por ello que se ha originado cierta controversia en la existencia o inexistencia de este subtipo. En consecuencia cierto número de investigadores han abordado dicha confusión y han propuesto que muy probablemente este subtipo corresponde al α_{1c} clonado (34 y 35), el cual se identificó inicialmente debido a que presentaba un perfil farmacológico distinto del subtipo α_{1b} y del α_{1d} , con una afinidad relativamente alta por el 5-Metilurapidil, por el WB4101 y una gran

sensibilidad a la inactivación irreversible por la cloroetilclonidina, esta última característica era la principal diferencia para distinguir entre el subtipo α_{1A} y el α_{1c} . Sin embargo actualmente se considera que la sensibilidad a la cloroetilclonidina es una característica que muy probablemente depende de la especie u organismo y no de los subtipos de receptores adrenérgicos.

Por otra parte las modificaciones postransduccionales del receptor, el tipo celular en que se 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, esta es una posible explicación para los resultados controversiales observados. Además la expresión de un ADNc en un determinado tipo celular, no necesariamente pudiera resultar en un receptor con propiedades farmacológicas idénticas al subtipo que se expresa en forma natural en un tejido determinado.

Subtipo α_{1B} adrenérgico.

Este subtipo fue el primero de la familia en ser clonado. La clona fue aislada de una línea celular (DD₁MF2) de vaso deferente de hamster y codifica para una proteína de siete dominios transmembranales (Fig.2). La expresión del ADNc resultó en una proteína con propiedades farmacológicas consistentes con el subtipo α_{1B} adrenérgico, que presenta una alta afinidad por la prazosina y una baja afinidad por la fentolamina, el 5-metil-urapidil y por la yohimbina y una sensibilidad alta a la inactivación irreversible por la cloroetilclonidina.

Por otra parte los análisis de tipo Northern de tejidos de rata, mostraron la expresión del ARNm para esta clona en los tejidos en donde se esperaba que expresaran el subtipo

α_{1b} , que incluye al hígado, bazo, corazón y corteza cerebral.

Subtipo α_{1d} adrenérgico.

Con una sonda de ADNc preparada del receptor α_{1B} , de hamster, se encontró una clona distinta para otro subtipo α_1 adrenérgico en una biblioteca genómica de cerebro de rata (20). La secuencia de aminoácidos de la proteína que expresa esta clona, es consistente con las proteínas de 7 dominios transmembranales (Fig 2). Mediante el análisis tipo Northern de la distribución en tejido del ARN mensajero transcrito por esta clona sugiere una distribución similar al subtipo α_{1A} , y el receptor expresado presenta alta afinidad por el WB 4101. Por tanto se concluye que esta clona representa el receptor α_{1A} farmacológico (20). Sin embargo al estudiar una clona casi idéntica, también aislada de cerebro de rata, se encontró una baja afinidad por los antagonistas más selectivos para el subtipo α_{1A} , el 5 metilurapidil y la (+)niguldipina. Así se concluye que existe una nueva clona y se le denomina α_{1d} (36).

Debido a que las clonas aisladas por Lomasney et al., (20) y por Pérez et al., (36) codifican para proteínas de 560 residuos de aminoácidos, estas difieren solamente en la secuencia en dos sitios (con un 99.8% de identidad aminoacídica), parece ser que representan el mismo subtipo. Pero el ADNc expresado es farmacológicamente distinto al receptor α_{1A} adrenérgico, que se expresa de forma natural en diferentes tejidos. Es por ello que a este receptor recombinante se le ha llamado $\alpha_{1a/d}$, aunque actualmente ya se hace referencia a éste como α_{1d} , hasta que puedan ser explicadas las discrepancias antes mencionadas.

Subtipos recombinantes.

Se han aislado y expresado tres ADNc de los receptores α_1 adrenérgicos. Aunque la relación de los subtipos recombinantes, con la de los receptores que se hallan presentes en los diferentes tipos celulares de manera natural, no es muy clara sino por el contrario es aún controversial, los datos sugieren al menos la existencia de tres subtipos; los α_{1A} , los α_{1B} y los α_{1D} .

Estos resultados han sugerido fuertemente la existencia de diferentes subtipos α_1 , con propiedades funcionales distintas. Sin embargo, la comparación entre las respuestas mediadas en diversos tejidos por receptores α_1 , no ha permitido establecer, de manera contundente, diferencias funcionales entre los subtipos. De hecho las diferencias observadas de los efectos causados por los α_1 en varios tejidos y/o tipos celulares, pudieran deberse a otros factores diferentes de la presencia de distintos subtipos de receptor. Estos factores incluyen variaciones en el número de receptores y diferencias en la composición de proteínas G y/o moléculas efectoras.

Sistema de Transducción

En la mayoría de los tejidos estudiados la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos causa la hidrólisis del polifosfoinosítido (PI), catalizada por la fosfolipasa C. Los productos resultantes de la hidrólisis del PI, incluye al IP3 o inositol 1,4,5 trifosfato y al diacilglicerol (DAG), que incrementan el calcio intracelular y activan a la proteína cinasa C (PKC) respectivamente (37) (Fig.3).

Algunos estudios recientes han mostrado que otras rutas de transducción tales como la fosfatidilcolina-fosfolipasa D (38) y la fosfolipasa A2 (39), también pueden ser activadas por la estimulación de los receptores α_1 .

SUBTIPOS α_2 -ADRENERGICOS.

Los adrenoreceptores α_2 se han subdividido con base en los estudios funcionales, de asociación de radio-ligando y varios receptores diferentes α_2 han sido clonados y expresados. De la misma manera que en la familia de los α_1 las relaciones entre los subtipos identificados por estas tres formas de subclasificación no han sido establecidas por completo, lo que está claro es que existen diferentes subtipos α_2 -adrenérgicos, con distintas especificidades por las drogas.

Todos los subtipos α_2 pueden ser activados por la noradrenalina y por la adrenalina y no hay evidencia de que estas catecolaminas fisiológicas muestren selectividad significativa entre cualquiera de los subtipos. Todos pueden ser bloqueados por la yohimbina y rauwolscina y marcados con análogos tritiados de estos antagonistas, aunque la afinidad puede variar substancialmente entre los subtipos.

Inicialmente la subclasificación de los α_2 se basó en la habilidad de la prazosina para inhibir la unión de la yohimbina [H^3] o rauwolscina [H^3] a los homogenados de una variedad de tejidos aislados o de líneas celulares en cultivo (40,41 y 42). La prazosina y otro antagonista α_1 -adrenérgico, el ARC 239, tienen alta afinidad por un grupo de α_2 -adrenérgicos, designados α_{2B} , y baja afinidad por otro, designado α_{2A} (Tabla II). El agonista parcial α_1 -adrenérgico, oximatazolina y el antagonista, BRL44408, inhiben selectivamente la unión al subtipo α_{2A} (43 y 44). Aunque hay evidencia funcional (45), que apoya esta subclasificación ha sido difícil el encontrar respuestas funcionales que muestren claramente un perfil farmacológico α_{2B} -adrenérgico.

Dos subtipos α_2 -adrenérgicos adicionales han sido propuestos, el α_{2C} y el α_{2D} , con base en la correlación de las afinidades de antagonistas para inhibir la unión de

rauwolescina [H^3] en diferentes células y preparaciones de tejidos (Tabla II).

Subtipos Recombinantes.

Tres clonas α_2 -adrenérgicas de ADNc han sido aisladas de bibliotecas genómicas humanas, (α_2C2 , α_2C4 y α_2C10) y tres clonas altamente homólogas, las cuales parecen ser especies homólogas de las tres clonas humanas, han sido aisladas de rata y de ratón. Aunque hay cierta controversia en la asignación del subtipo para una de las clonas de rata (RG20), los adrenoreceptores α_2 recombinantes parecen corresponder a los subtipos α_2 , identificados por estudios de asociación de radioligando (46).

Sistema de Transducción

Hasta la fecha en casi cada sistema estudiado la activación de los receptores α_2 inhiben a la adenilato ciclase (Fig.3). Sin embargo, en muchos casos los efectos fisiológicos mediados por los α_2 no pueden ser explicados solamente por una disminución en el AMPc intracelular. Se ha reportado la activación de varios mecanismos de transducción para los α_2 , que incluye a la activación de canales de K^+ (47), la inhibición de canales de Ca^{2+} (48) el incremento en el intercambio Na^+/H^+ (49) y la movilización de Ca^{2+} intracelular (50).

Además de la inhibición de la adenilato ciclase, la estimulación de ambos subtipos α_2C10 y α_2C4 causa la activación directa de la fosfolipasa C, por medio de una proteína G sensible a la toxina de Pertussis (PTX) (51).

ESTUDIOS DE ASOCIACION DE LIGANDO-RECEPTOR.

Los estudios de asociación de ligando(s) proveen un acercamiento directo a la investigación *in vitro* de los receptores, y se aplicó de manera muy amplia a la subclasificación de los receptores, así como en estudios funcionales y de localización. Este tipo de ensayos surgieron por primera vez, como una propuesta práctica, debido a la disponibilidad de ligandos marcados radioactivamente, con tritio o iodo, específicos para el receptor y con alta actividad específica.

El protocolo general en un ensayo de asociación es el siguiente; (52)

- 1- Escoger y hacer una preparación de tejido que contenga al receptor.
- 2- Seleccionar un ligando marcado adecuadamente con tritio o yodo.
- 3- Incubar la preparación del receptor, con una concentración apropiada de un ligando marcado, por tiempo y temperatura definidas.
- 4- Separar el ligando que se unió del ligando libre, por medio de una técnica de separación apropiada, (Por centrifugación o filtrado).
- 5- Medir las concentraciones del ligando que unió y la del ligando libre.
- 6- Repetir pasos 3 a 5 y añadir los ligandos no marcados o agentes moduladores, de acuerdo a los objetivos del experimento.
- 7- Analizar los datos para obtener estimaciones cuantitativas de las constantes de proporción y las constantes de afinidad.
- 8- Relacionar los parámetros obtenidos con valores determinados farmacológicamente.

Uno de los problemas mas grandes de interpretación en cualquier estudio de asociación, es la identificación del sitio de unión como un receptor y no como un posible artefacto o sitios de unión no específicos. A continuación se describen los criterios básicos en la identificación del receptor (53);

• Saturación

La propiedad de ser saturable es un requisito mínimo para la asociación del receptor. Esta propiedad es fácilmente demostrable al agregar concentraciones crecientes del ligando radioactivo, a una mezcla del ligando no-radioactivo con el tejido y ver si la asociación del ligando radioactivo disminuye. En general, esto puede ocurrir a concentraciones del ligando comparables a las requeridas para producir un efecto biológico, típicamente en el intervalo nanomolar.

Así el número calculado de sitios de unión o asociación debe de ser finito y limitado, esto ocurre generalmente para la mayoría de los receptores identificados en el orden de unos cuantos centenares a unos cuantos cientos de miles por célula o 1 a 100 pmol/g de peso húmedo.

• Distribución

La asociación del receptor con una hormona, neurotransmisor u otra sustancia, debe de presentarse en tejidos o regiones en donde se conoce que existe la sustancia y que es activa y no debe presentarse en donde se conoce que la sustancia no está o está inactiva.

• Farmacología

Cuando suficientes drogas o análogos de hormonas y/o neurotransmisores, muestran tener órdenes de potencia parecidos o paralelos al competir por la asociación y producir una respuesta, resulta casi imposible asignar esta correlación a otra cosa que no sea un receptor.

• Cinética

La cinética de la asociación ha sido de mayor interés teórico que práctico en la identificación del receptor. El fenómeno de asociación debe de ser al menos tan rápido como la aparición del efecto. La generalización más útil es que un ligando irreversible no debe tener efectos reversibles y viceversa.

• Desnaturalización

Este criterio surge al considerar la naturaleza proteica de la mayoría de los receptores. La exposición del tejido a condiciones desnaturalizantes, tales como el calentamiento o valores de pH extremos, debe destruir la asociación.

Hay tres tipos básicos de experimentos que se pueden realizar en los estudios de asociación (54).

- Los experimentos de saturación en donde L_T se incrementa y RL se determina al equilibrio ($I=0$).
- Los experimentos cinéticos en los cuales RL se determina en función del tiempo manteniendo L_T constante, y

- Los experimentos de inhibición en donde RL se determina conforme la concentración de una droga no marcada se incrementa y. L_T se mantiene constante.

R; es la concentración de sitios de unión libres o no ocupados.

L; es la concentración del ligando radioactivo libre.

I; es la concentración de la droga no marcada.

RL y RI; son las concentraciones del receptor unido con el ligando marcado y no marcado con radioactividad respectivamente.

L_T ; es la concentración del ligando total

Así en un experimento de asociación del receptor, en el cual la ley de acción de masas es válida, se puede escribir;



En la mayoría de los experimentos RL es la variable experimental a medir, es decir la variable dependiente.

Por otro lado la concentración del ligando total (L_T) se relaciona con la concentración del ligando libre por;



Como se observa los modelos matemáticos y ecuaciones utilizadas en los estudios de asociación del receptor son esencialmente equivalentes a los utilizados en cinética enzimática.

Experimentos de Saturación

En un experimento de saturación, la concentración del receptor se mantiene constante y RL se determina en el equilibrio como función de L, esto es;



Una forma de expresar los datos sería el graficar RL vs L (Fig 5, Panel A).

En donde la K_D , o constante de disociación, es igual a la concentración de L a la cual se ocupa la mitad del total de los receptores y se define como;

$$K_D = [R][L]/[RL]$$

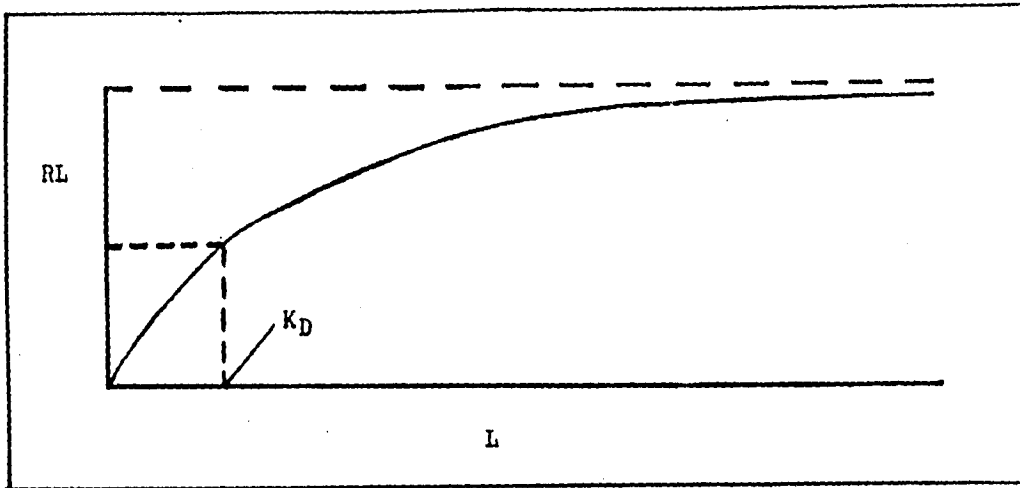
y en donde RT, es la concentración total de receptor.

La gráfica describe una hipérbola rectangular y es matemáticamente equivalente a la curva de Michaelis-Menten, de cinética enzimática y a la isoterma de adsorción de Langmuir.

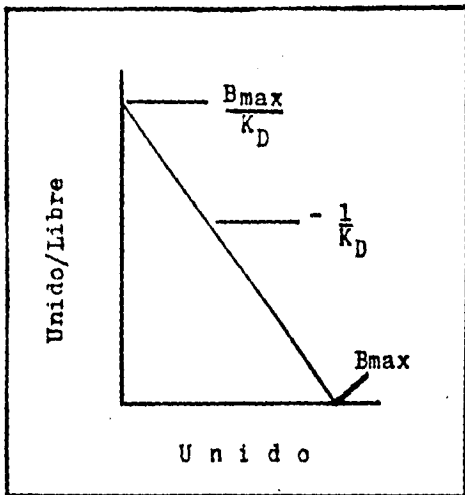
Debido a que la curva de saturación no es una relación lineal, los parámetros RT y K_D no se pueden determinar fácilmente, por lo cual se tiene que hacer una transformación para dar una relación lineal y obtener así los parámetros. La transformación más utilizada en los estudios de asociación del receptor es análoga a la desarrollada por Eadie (1942) y Hofstee (1952) en cinética enzimática. Una transformación similar fue desarrollada por Scatchard (55), para la interacción de proteínas con pequeñas moléculas y es apropiado utilizar esta relación cuando se conoce la concentración y el peso molecular de la macromolécula, sin embargo cuando estos valores no son conocidos, se utiliza el análisis sugerido por Rosenthal (56). Las tres regresiones lineales mencionadas son matemáticamente equivalentes y de hecho el análisis de Rosenthal es comúnmente llamado análisis de Scatchard.

El análisis de Rosenthal se obtiene al graficar una relación del ligando que se Unió y del Libre (Unido/Libre) vs el ligando que se Unió (Unido) (Fig.5 Panel B).

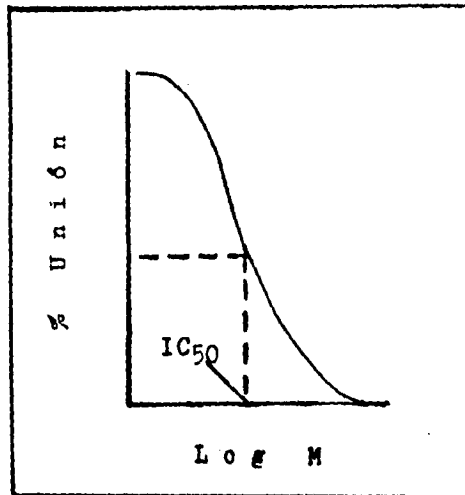
En donde Unido = RL (concentración del receptor unido con el ligando marcado). Libre = L (concentración del



A



B



C

FIGURA 5

Panel A) Curva de Saturación; RL, Receptor / Ligando; L, Ligando; K_D , Constante de Disociación. Panel B) Transformación lineal tipo Rosenthal; B_{max} , Número máximo de sitios de unión; K_D , Constante de Disociación; Panel C) Curva de Competencia; IC_{50} , Concentración necesaria del ligando para alcanzar la mitad de la inhibición.

ligando radioactivo libre) y $R_T = B_{max}$ (número máximo de sitios de unión).

La K_D es el inverso negativo de la pendiente de la línea. El intercepto en el eje de las abscisas es igual al número máximo de sitios de unión o B_{max} .

Experimentos de Inhibición o Competencia.

En estos experimentos se mantiene R_T y L_T constantes y se varía la concentración del ligando no marcado I. Debido a que se lleva a cabo una inhibición competitiva, a estos experimentos comúnmente se les denomina estudios de competencia. La utilidad de los estudios de inhibición consiste en que la potencia de cualquier droga por el receptor (o con mayor precisión, al sitio de unión del radioligando), puede ser fácilmente determinada.

De estos estudios los parámetros importantes son;

- La constante de inhibición (KI) definida como;

$$KI = [R][I]/[RI] \quad KI = IC50 / 1 + [H] / KD$$

- La $IC50$; es la concentración necesaria para inhibir el 50% de la unión.

El método más simple para determinar el valor de la $IC50$ para una droga dada es mediante la gráfica semi-logaritmo de dosis-respuesta estándar, en la cual se grafica el logaritmo de la concentración (en el eje de las abscisas), contra el porcentaje de la unión o asociación del ligando (en el eje de las ordenadas) (Fig.5 Panel C).

ANTECEDENTES

Algunos experimentos realizados en el hígado de gato perfundido (57 y 58) han mostrado que la glucogenólisis hepática es producida por la estimulación con agonistas de los receptores alfa y beta adrenérgicos. Por otro lado a la respuesta hiperglucémica, también producida, se le ha asociado con la activación de la forforilasa a y el aumento en el contenido de AMPc intracelular a través de los receptores β adrenérgicos. La respuesta hiperglucémica se ha asociado con la activación de la fosforilasa a, pero de manera independiente del AMPc, vía los receptores α adrenérgicos, lo cual corrobora el acoplamiento de los receptores α y β adrenérgicos a diferentes sistemas de transducción. Con estos resultados se comprueba, mediante el uso de agonistas y antagonistas en la producción de algunas respuestas fisiológicas, la existencia de receptores α y β adrenérgicos en el hígado de gato e incluso se asigna la participación del subtipo β_2 en la respuesta hiperglucémica y la hiperlactoacidemia.

Por otro lado se ha determinado la presencia de receptores α y β adrenérgicos en distintos tejidos del gato doméstico, como en el caso de las terminales nerviosas en las arterias cerebrales, en donde por medio de estudios de asociación y competencia de ligando-receptor se determinó la presencia de los subtipos α_{2A} y α_{2B} (59). La mayoría de los tejidos estudiados son del tipo nervioso en donde se ha comprobado la presencia ya sea presináptica o postsináptica de los receptores α_1 , α_2 y β_2 (60, 61 y 62).

Actualmente se han caracterizado los subtipos α_1 -adrenérgicos presentes en el hígado de algunas especies de mamíferos, así por ejemplo el hígado de cuyo (63), el de conejo (63) y humano (64 y 65) expresan el α_{1A} , el de rata, ratón y hamster (66), expresan el α_{1B} . Además se ha comprobado que el subtipo α_{1B} -adrenérgico, también se expresa en el hígado de pollo (67) y del pez (68).

O B J E T I V O

Nos propusimos el caracterizar farmacológicamente al subtipo de receptor α_1 -adrenérgico presente en hepatocitos de gato, *Felis domesticus* , para tener un panorama más amplio de la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en el tejido hepático. Y así poder avanzar en el conocimiento de la expresión tejido específica y especie específica de los diferentes elementos en los sistemas de transducción de señales.

MATERIALES Y METODOS

QUIMICOS.

La (-)epinefrina, (-)norepinefrina, oximetazolina y prazosina se obtuvieron de Sigma Chemical Company. El 5-metil-urapidil, WB4101, spiperona, cloroetilclonidina y benoxatian, se obtuvieron de Research Biochemicals International. La fentolamina y la metoxamina fueron donados por las compañías farmaceuticas Ciba-Geigy y Burroughs Wellcome, respectivamente. La prazosina[H^3] (71.80 Ci/mmol), se obtuvo de la planta nuclear de Nueva Inglaterra.

ANIMALES.

Se utilizaron gatos domésticos adultos machos, de un peso corporal aproximado de $2,821.89 \pm 66.02$ g. Los animales fueron alimentados con pollo y con el alimento comercial para gatos (gatina) y fueron sacrificados por medio de una sobredosis de CO_2 en una cámara de gases.

OBTENCION DE MEMBRANAS DE HEPATOCITOS.

Las técnicas empleadas para aislar las membranas plasmáticas de hepatocitos fueron:

- La descrita por Neville (69) por medio de un gradiente discontinuo de sacarosa, y
- La descrita por Loten y Redshaw-Loten (70) por medio de un agente auto-formador de gradientes (Percoll).

La cantidad de proteína en las membranas obtenidas por ambas metodologías se cuantificó por el ensayo de Lowry et

al (71), en el cual se utiliza albúmina sérica bovina como estándar.

ENSAYOS DE ASOCIACION DEL LIGANDO RADIOACTIVO PRAZOSINA[H³].

Los estudios de asociación se realizaron mediante la incubación de las membranas (50 a 100 ug) con el ligando radioactivo en una solución amortiguadora (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.5) en ausencia y presencia de los diferentes agonistas o antagonistas que se indican en cada caso, en un volumen total de 0.25 ml durante 60 minutos en un baño de agua a 25°C. Al final de la incubación se agregaron 10 ml de amortiguador frío a la suspensión de membranas y se filtró inmediatamente al vacío a través de filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman) previamente remojados en la solución amortiguadora. Los filtros se lavaron tres veces (10 ml cada una) con el mismo amortiguador.

La cuantificación del ligando radioactivo unido a los receptores se determinó en un contador de centelleo líquido, para ello los filtros una vez lavados se colocaron en frascos de vidrio a los que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo a cada uno.

Experimentos de saturación.

Los experimentos de saturación se realizaron por medio de concentraciones crecientes en el intervalo de 0.08 a 12 nM de prazosina[H³]. La asociación no-específica se evaluó en la presencia de 1 µM de fentolamina (antagonista selectivo α₁-adrenérgico); por otra parte la unión específica se determinó por la diferencia entre la cantidad de prazosina[H³] total unida y la unión no específica.

Experimentos de competencia.

En los ensayos de competencia se utilizó una concentración de 0.9 ± 0.2 nM del ligando radioactivo, con lo que se logra una ocupación del receptor del 61 ± 3 %, al incubar las membranas en presencia de los siguientes agonistas; epinefrina, norepinefrina, metoxamina y oximetazolina, y de los antagonistas; prazosina, fentolamina, 5 metil-urapidil, WB4101, benoxatian y spiperona, en las concentraciones indicadas para cada ensayo.

PRETRATAMIENTO CON CLOROETILCLONIDINA (CEC).

Se realizaron experimentos de competencia al incubar las membranas pretratadas con el antagonista irreversible cloroetilclonidina, con una concentración de 0.9 ± 0.2 nM del ligando radioactivo y en presencia de $1 \mu\text{M}$ del antagonista fentolamina. Las membranas fueron preincubadas en ausencia y presencia de la CEC a diferentes concentraciones, a 37°C por 15 minutos.

ANALISIS DE RESULTADOS.

Los datos obtenidos de los estudios de asociación de prazosina[H^3](saturación y competencia), se analizaron mediante los programas EBDA y LIGAND (72) (Biosoft-Elsevier). Los valores de B_{max} (número máximo de sitios de unión o de receptores) y de la K_d (constante de afinidad) para la unión específica de prazosina[H^3] se obtuvieron por el análisis de Scatchard (Rosenthal) de los resultados obtenidos en los experimentos de saturación.

.La capacidad para inhibir la unión específica de la prazosina[H³] de los distintos agonistas y antagonistas, se determinó calculando la constante de inhibición (K_i) de acuerdo a la ecuación de Cheng y Prusoff (73): $K_i = IC_{50} (K_d / (L + K_d))$.

RESULTADOS

Se determinó la presencia y número de receptores α_1 -adrenérgicos en las membranas hepáticas del gato doméstico, mediante experimentos de asociación del ligando radioactivo, prazosina[H^3], un antagonista selectivo para la subfamilia de los α_1 -adrenérgicos. Al utilizar concentraciones crecientes del radioligando se observó una unión reversible y saturable, que alcanzó un estado de máxima saturación alrededor de una concentración de 12 nM del radioligando, equivalente a 180 fmol/mg de proteína aproximadamente, lo cual representa el número máximo de sitios de unión (B_{max}) para el radioligando o número de receptores α_1 -adrenérgicos. Y la ocupación de la mitad de los receptores se alcanza a una concentración aproximada de 1 nM del radioligando, valor que equivale a la KD o constante de afinidad (Fig 6).

Para obtener valores más reales de la KD y de la B_{max} y no valores aproximados, se hizo una regresión lineal al graficar la relación del ligando que unió y el libre, unido/libre, vs el ligando que unió, unido, es decir el análisis de Rosenthal o comúnmente llamado análisis de Scatchard, como se observa en el recuadro (Fig 6), en donde la intersección de la recta con el eje de las abscisas representa el número máximo de sitios de unión, o $B_{max} = 188$ fmol/mg de proteína, de membranas hepáticas y en donde la pendiente de la recta da el valor inverso negativo, $-1/KD$, de la constante de afinidad. Este valor al ser convertido se obtuvo una KD de 0.79 nM. El comportamiento lineal obtenido por medio de este análisis, demuestra la existencia de una población homogénea de receptores α_1 -adrenérgicos.

La caracterización del subtipo de receptor se realizó utilizando agonistas y antagonistas selectivos para los receptores α_1 -adrenérgicos, cuyas afinidades varían para los diferentes subtipos de receptor, así es posible

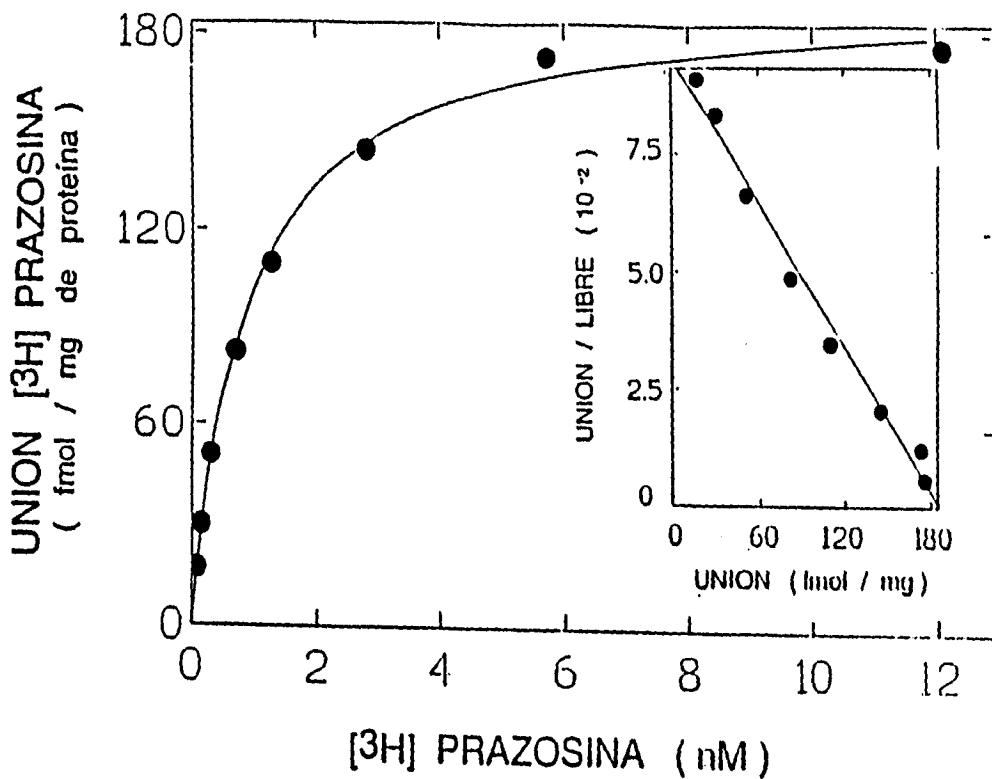


FIGURA 6

Curva de saturación de prazosina[H^3] y análisis de Scatchard. En membranas de hígado de gato al ser incubadas con el radioligando de 0.08 a 12.0 nM y fentolamina 1 μ M (para la unión no-específica). Se muestra el pegado específico de prazosina[H^3] a receptores α_1 -adrenérgicos y el análisis de Scatchard. Las figuras son representativas de 8 a 10 experimentos al usar diferentes preparaciones de membranas en cada caso.

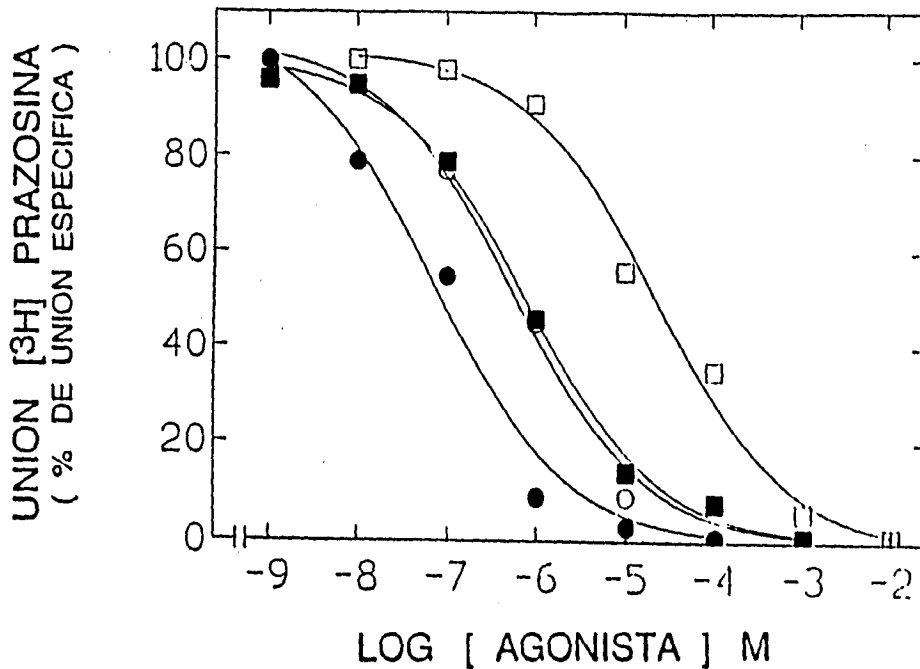


FIGURA 7

Competencia de los agonistas α_1 adrenérgicos por los sitios de unión a prazosina[H^3] en membranas de hígado de gato. Las membranas fueron incubadas en presencia de 0.9 ± 0.2 nM de prazosina[H^3] y con diferentes concentraciones de los siguientes agonistas: Oxymetazolina, círculos llenos; Epinefrina, círculos vacíos; Norepinefrina, cuadros llenos y Metoxamina, cuadros abiertos. Las figuras son representativas de 5 a 6 experimentos al usar diferentes preparaciones de membrana.

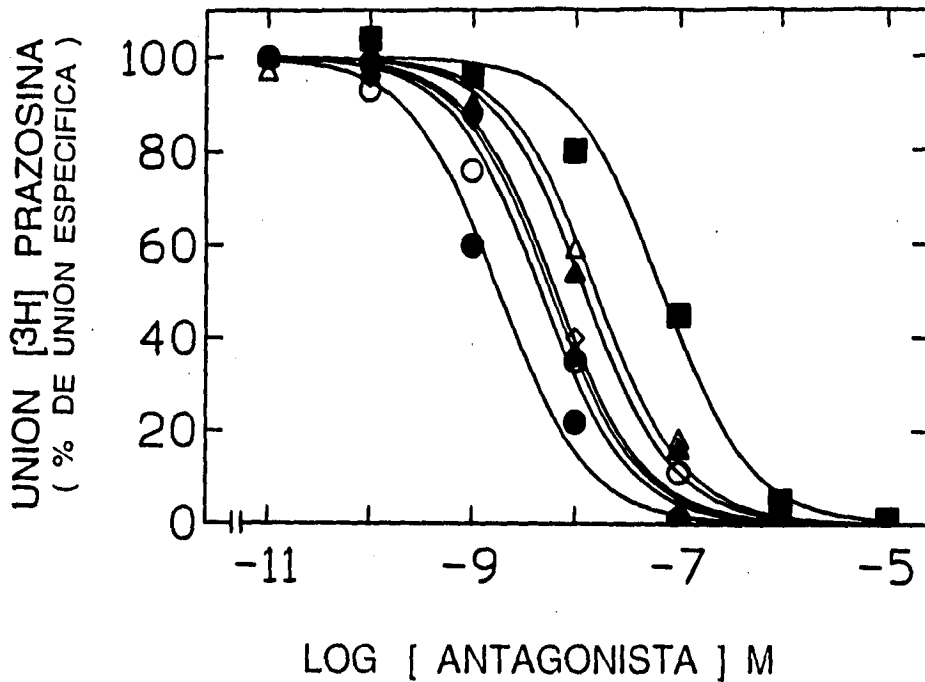


FIGURA 8

Competencia de los antagonistas α_1 adrenérgicos por los sitios de unión a prazosina[H^3] en membranas de hígado de gato. Las membranas fueron incubadas en presencia de 0.9 ± 0.2 nM de prazosina[H^3] y con diferentes concentraciones de los siguientes antagonistas: WB4101, círculos llenos; Prazosina, círculos vacíos; Niguldipina, rombos llenos; Benoxatian, rombos vacíos; 5-Metil-urapidil, triángulos llenos; Spiperona, triángulos vacíos y Fentolamina, cuadros llenos. Las figuras son representativas de 5 a 8 experimentos al usar diferentes preparaciones de membrana.

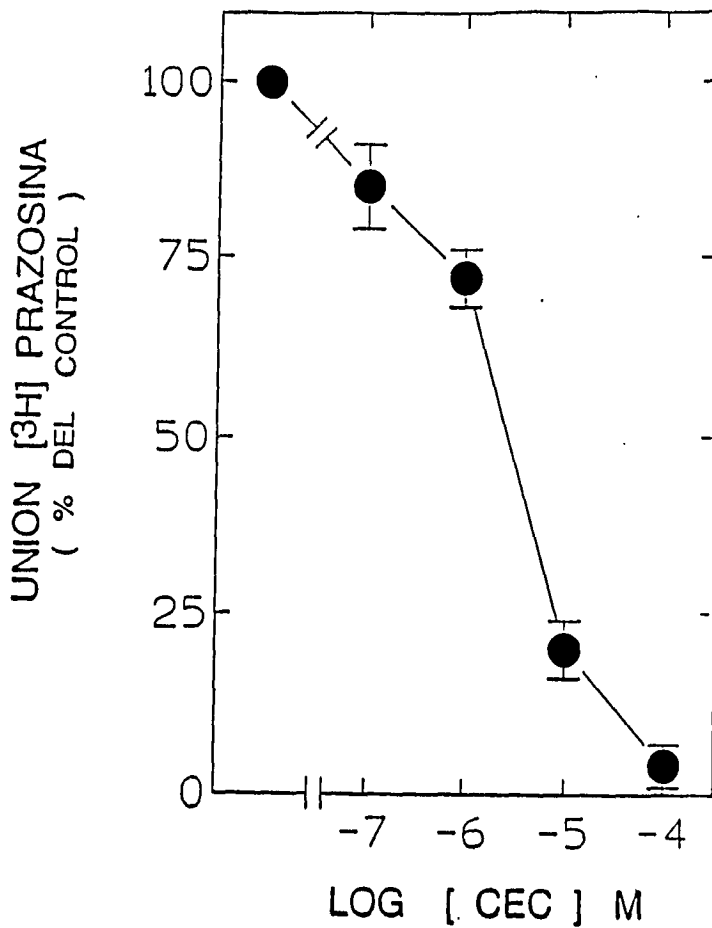


FIGURA 9

Efecto de la preincubación con cloroetilclonidina.

Las membranas fueron preincubadas con el antagonista cloroetilclonidina a diferentes concentraciones durante 15 minutos a 37°C y se realizó una curva de desplazamiento con prazosina[H³] y fentolamina 1 uM. La figura es el promedio de 5 experimentos al usar diferentes preparaciones de membranas.

TABLA III
PARAMETROS DERIVADOS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACION Y COMPETENCIA DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS POR LOS SITIOS DE UNION A LA PRAZOSINA [H³] EN LOS HEPATOCITOS DEL GATO.

| Agonistas: | K _i (nM) | Pendiente |
|----------------------|---------------------|-------------|
| Oximetazolina (6) | 55 ± 16 | 0.80 ± 0.09 |
| (-)Epinefrina (6) | 351 ± 90 | 0.70 ± 0.12 |
| (-)Norepinefrina (5) | 375 ± 87 | 0.70 ± 0.07 |
| Metoxamina (6) | 8,725 ± 2,800 | 0.55 ± 0.05 |
| Antagonistas: | | |
| WB4101 (6) | | |
| Prazosina (5) | 0.93 ± 0.26 | 0.85 ± 0.05 |
| Niguldipina (6) | 1.60 ± 0.50 | 0.85 ± 0.06 |
| Benoxatian (5) | 1.96 ± 0.65 | 0.90 ± 0.08 |
| 5-Metil-urapidil (6) | 2.50 ± 0.60 | 0.93 ± 0.04 |
| Siperona (4) | 5.25 ± 0.98 | 0.88 ± 0.04 |
| Fentolamina (5) | 6.60 ± 1.0 | 0.95 ± 0.09 |
| | 25 ± 4 | 1.00 ± 0.09 |

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

distinguirlos. La técnica empleada fue el ensayo de competencia fundamentado en el uso de una concentración fija del radioligando, prazosina[H^3], alrededor de la $KD = 0.9 \pm 0.2$ nM y de concentraciones crecientes de los diferentes agonistas y antagonistas. De esta manera se obtuvieron las curvas de competencia ilustradas en las figuras 7 (agonistas) y 8 (antagonistas). Los valores de las constantes de inhibición o K_i se muestran en la Tabla III y con base en estos valores el orden de potencia para desplazar la unión de la prazosina[H^3] fue:

- Para los agonistas;

Oximetazolina > Epinefrina = Norepinefrina > Metoxamina

- Y para los antagonistas:

WB4101 \geq Prazosina \geq Niguldipina \geq Benoxatian > 5 MU \geq Spiperona > Fentolamina

También para caracterizar el subtipo de receptor presente en las membranas hepáticas de gato, se realizaron experimentos de competencia, como se indica en materiales y métodos, con el antagonista irreversible cloroetilclonidina (CEC), para determinar el grado de sensibilidad de los receptores por este agente. Así en la figura 9 se muestra una disminución importante, de hasta el 96%, en la unión específica de la prazosina[H^3], lo cual demuestra la alta sensibilidad de los receptores por la CEC.

DISCUSION

Los datos obtenidos comprueban la existencia de receptores α_1 -adrenérgicos en el hígado del gato y muestran la presencia predominante del subtipo α_{1A} -adrenérgico en este órgano.

En la fase inicial de este trabajo se seleccionó el ligando marcado radioactivamente para realizar los estudios de asociación y competencia, mediante la realización de algunos experimentos de saturación, los cuales arrojaron datos preliminares del número de receptores presentes en las preparaciones de membranas plasmáticas de los hepatocitos del gato. La cantidad de receptores fue menor a la reportada en otras especies, como en el hígado de rata (65 y 66).

Así los primeros estudios de saturación con el radioligando prazosina[H^3], antagonista altamente selectivo por los receptores α_1 -adrenérgicos, sugirieron claramente la presencia de receptores adrenérgicos correspondientes a la familia de los α_1 . Para corroborar ésto nos propusimos caracterizar al subtipo de receptor del cual se trataba mediante la prueba de una serie de agentes adrenérgicos altamente selectivos por los diferentes subtipos α_1 .

La afinidad relativamente alta que se observó por los antagonistas reversibles; WB4101, Niguldipina, Benoxatian y 5 Metil-urapidil, indicó claramente que el receptor presente en el hígado del gato doméstico pertenece al subtipo α_{1A} -adrenérgico.

Actualmente existe cierta confusión en la asignación de los adrenoreceptores recombinantes $\alpha_{1A/d}$ y α_{1c} , con los subtipos α_1 -adrenérgicos farmacológicamente definidos.

Está claro que la clona del subtipo $\alpha_{1A/d}$ no corresponde con el subtipo α_{1A} definido farmacológicamente. Por tanto es posible que esta clona represente un nuevo subtipo (α_{1D}). Por otro lado, como ya se ha mencionado, algunos datos recientes sugieren que la clona α_{1c} , al menos la homóloga de

rata, podría corresponder al subtipo α_{1A} definido farmacológicamente (37 y 38).

El subtipo α_{1c} recombinante de rata, cuando se le compara con los otros dos subtipos α_1 recombinantes, presenta una sensibilidad significativamente menor a la inactivación irreversible por la cloroetilclonidina y las afinidades mostradas por los antagonistas correlacionan con las del subtipo nativo α_{1A} -adrenérgico.

Así la única diferencia, actualmente considerada como un criterio débil, entre el subtipo α_{1c} recombinante y el α_{1A} definido por farmacología, es la sensibilidad al antagonista irreversible cloroetilclonidina, este último subtipo es un receptor insensible a dicho agente, mientras que el subtipo α_{1c} presenta diferentes grados de sensibilidad a la cloroetilclonidina. Parece ser que estas diferencias en sensibilidad dependen de la especie, aunque no se ha hecho una comparación directa entre homólogos de especies del receptor recombinante α_{1c} -adrenérgico.

Debido a lo anterior en este trabajo al receptor α_{1c} -adrenérgico se le maneja de manera indistinta e igual al receptor α_{1A} -adrenérgico.

Por otra parte es importante hacer hincapié en la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos en el hígado de los diferentes organismos. Ya que hasta la fecha no se ha observado ningún patrón específico en la expresión de un determinado subtipo de receptor, por especie o grupo de especies. Se sabe que la expresión del receptor α_{1B} es predominante en el tejido hepático de la mayoría de las especies estudiadas, sin embargo se desconoce el motivo funcional de la expresión de otros subtipos que no sean el α_{1B} , en los hígados de otras especies. Es decir, la interrogante del por qué de la expresión diferencial de estos receptores en las distintas especies queda aún por ser esclarecida.

El hecho de que todos los diferentes subtipos α_1 -adrenérgicos estén acoplados al mismo mecanismo

transduccional (recambio de fosfoinosítidos-Calcio), no resuelve tal interrogante, sin embargo conduce a pensar que probablemente exista alguna diferencia funcional entre los subtipos en cuanto a los mecanismos de desensibilización de los receptores.

Actualmente se conoce que los subtipos α_1 -adrenérgicos, no sólo están acoplados al sistema transduccional de fosfoinosítidos-calcio, sino que también pueden estar acoplados a otros sistemas de transducción (fosfatidilcolina-fosfolipasa D (38) y la fosfolipasa A2 (39)), lo cual como se ha demostrado recientemente (75), depende del tipo celular en que se expresen los receptores y no necesariamente del subtipo de receptor *per se*. Además recientemente se han estudiado las respuestas producidas por el recambio de fosfoinosítidos-calcio en hepatocitos de diferentes especies (76) y se han observado algunas desigualdades en las cinéticas de producción de IP_3 y $(Ca^{2+})_i$, sin embargo tales resultados parecen ser más el producto de diferencias de las células mismas que de los subtipos de receptores que expresan.

Mediante la caracterización farmacológica del subtipo α_{1A} -adrenérgico realizada en este trabajo, se corroboró y se especificó la existencia de receptores tipo α_1 -adrenérgicos en los hepatocitos del gato. Dicha caracterización no se había realizado anteriormente, es decir se carecía de estudios de este tipo, ya que en los hepatocitos de gato sólo se habían medido respuestas metabólicas, como el incremento en la glucogenólisis (59 y 60), en respuesta a la estimulación por agonistas y antagonistas adrenérgicos, de donde se comprobó la participación de receptores α y β adrenérgicos.

No obstante, se han reportado algunos estudios de asociación y competencia de ligandos para comprobar la presencia de receptores α_1 en diversas terminales nerviosas del gato y determinar la localización presináptica y/o

postsináptica, sin embargo no existe información en la literatura acerca del mismo tipo de estudios en el hígado.

Al retomar la interrogante del por qué de la expresión diferencial de los distintos subtipos α_1 -adrenérgicos en las células hepáticas de diversas especies, cabe señalar la importancia de los cambios sufridos por el órgano durante el desarrollo del individuo, es decir la expresión de los receptores es tejido y tiempo específicos. Este aspecto se puede observar de forma muy clara en el hígado de la rata. En tal caso existe una relación de la expresión del receptor adrenérgico con la edad del organismo, de manera tal que en la primera fase de vida del mismo (antes del estado adulto), el receptor adrenérgico que se expresa predominantemente en el hepatocito es el β , mientras que en la fase adulta la población de este receptor disminuye notablemente, ahora se expresa de forma mayoritaria el receptor α_{1B} -adrenérgico. Así la expresión del tipo de receptor adrenérgico en el hígado de la rata depende del desarrollo del organismo, lo cual abre la posibilidad de que el mismo patrón pudiese pasar en otras especies incluyendo al gato.

Por otra parte existe un gran número de diferencias entre especies en la inervación extrínseca del hígado, por ejemplo los nervios frénicos no siempre inervan al hígado de humano y gato. El hígado de rata sólo es inervado por el nervio vago anterior, mientras que los hígados de humano, gato y perro son inervados por ambos troncos vagos (77). Así mismo la extensión y distribución de los nervios colinérgicos y adrenérgicos intrahepáticos también difieren considerablemente entre especies. En primates, como en el mono rhesus y en el humano, la inervación intralobular catecolaminérgica es abundante, en contraste con la rata en donde parece ser escasa (77). El cual a diferencia de otras especies presenta gran cantidad de nervios colinérgicos intralobulares, como se demostró por métodos histoquímicos (77). Todas estas diferencias de inervación en los hígados de diferentes especies, en su conjunto definen de manera muy

puntual el metabolismo hepático entre las especies. Además tales diferencias de inervación en el órgano podrían ejercer efecto sobre la expresión específica de los subtipos α_1 -adrenérgicos, que se expresan en el hígado de las especies.

Finalmente se piensa que el subtipo de receptor α_{1B} adrenérgico es el más primitivo de los α_1 en términos evolutivos, de acuerdo a los estudios realizados en diversas especies en cuanto a su expresión en hígado en nuestro laboratorio. En hepatocitos de pez gato y de aves se expresa el α_{1B} -adrenérgico (67 y 68). Mientras que en mamíferos existe una gran heterogeneidad de los subtipos adrenérgicos, en hígado de rata, ratón y hamster se expresa el α_{1B} (66), en el hígado de conejo, humano y perro se expresa el α_{1A} . Así, con la caracterización del subtipo α_{1A} -adrenérgico en el hígado de gato, se apoya la argumentación experimental de que el subtipo α_{1B} surgió primero desde un punto de vista filogenético.

C O N C L U S I O N

El subtipo de receptor adrenérgico identificado en las células hepáticas del gato fue predominantemente el α_{1A} -adrenérgico, de acuerdo al perfil farmacológico que presentó, en el que se obtuvo el siguiente orden de potencia para los agonistas: Oximetazolina > Epinefrina = Norepinefrina > Metoxamina y para los antagonistas: WB4101 \geq Prazosina \geq Niguldipina \geq Benoxatian > 5 MU \geq Spiperona > Fentolamina .

Así, con los resultados obtenidos se amplía el conocimiento de la expresión de los receptores de los α_1 en el hígado de distintas especies.

B I B L I O G R A F I A

1. Stent S G (1972) Cellular Communication. *Sci Amer* **9**:2-12.
2. García-Sáinz J A (1987) Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. FCE SEP México 108 pp.
3. Lehninger L A, Nelson L D y Cox M M (1993) Principles of Biochemistry. Second Edition Worth Publishers New York 1013 pp.
4. Goodman G A, Rall W T, Nies S A y Taylor P (1990) The Pharmacological Basis of Therapeutics. Eighth Edition Pergamon Press USA 1811 pp.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K y Watson D J (1989) Molecular Biology of The cell. Second Edition Garland Publishing Inc New York 1218 pp.
6. Gilman G A (1987) G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Ann Rev Biochem* **56**:615-49.
7. Langley J N (1878) *J Physiol* **1**:339-369.
8. Himmelweit F (1956-1960) The collected papers of Paul Ehrlich. 3 Vols Pergamon Press Oxford.
9. Langley J N (1905) *J Physiol* **33**: 374-413.
10. Lefkowitz R J (1981) Receptors and recognition. Series B Vol 13 "Receptor regulation". London-New York Chapman and Hall 253 pp.
11. Ahlquist R P (1948) *Am J Physiol* **154**:586-99.
12. Powell C E y Slater I H (1957) Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloro analog of isoprenaline. *J Pharmacol Exp Ther* **122**: 480-488.
13. Lands A M, Arnold A, McAuliff J P, Luduena F P y Brown T G (1967) Differentiation of receptors systems activated by simpatomimetic amines. *Nature(London)* **214**:597-598.
14. Langer S Z (1977) Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmitter release. *Br J Pharmacol* **60**:481-497.
15. Berthelsen S y Pettinger W A (1977) A functional basis for classification of alpha-adrenergic receptors. *Life Sci* **21**:595-606.

16. Dixon R, Sigal I S, Candelore M R, Register R B, Scattergood W, Rands E y Strader C D (1987) Structural features required for ligand binding to the β -adrenergic receptor. *EMBO J* **6**:3269.
17. Rands E, Candelore M R, Cheung A H, Hill W S, Strader C D y Dixon R (1990) Mutational analysis of β -adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem* **265**:10759.
18. Schiwnn D A, Lomasney J W, Lorenz W, Szklut P J, Freneau R T Jr, Yang-Feng T L, Caron M G, Lefkowitz R J y Cotecchia S (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem* **265**:8183-8189.
19. Lomasney J W, Cotecchia S, Lefkowitz R J y Caron M G (1991) Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. *Biochem Biophys Acta* **1095**:127-139.
20. Lomasney J W, Cotecchia S, Lorenz W, Leung W Y, Schwinn D A, Yang-Feng T L, Brownstein M, Lefkowitz R J y Caron M G (1991) 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**:6365-6369.
21. Dooley D J, Bittiger H y Reymann N C (1986) CGP 20712A: a useful tool for quantitating β_1 and β_2 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* **130**:137-139.
22. O'Donnell S R y Wanstall J C (1980) Evidence that ICI 118,551 is a potent highly beta-2-selective adrenoceptor antagonist and can be used to characterize beta-adrenoceptor populations in tissues. *Life Sci* **27**:671-677.
23. Langin D, Portillo M P, Saulnier-Blanche J S y Lafontan M (1991) Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur J Pharmacol* **199**:291-301.
24. Emorine L J, Feve B, Pairault J, Briend-Sutren M, Nahmias C, Marullo S, Delavier-Klutchko C y Strosberg D A (1992) The human β_1 -adrenergic receptor: relationship with atypical receptors. *Am J Clin Nutr* **55** (Suppl.1):215-218.
25. Tate K M, Briend-Sutren M M, Emorine L J, Delavier-Klutchko C, Marullo S y Strosberg D A (1991) Expression of three human β -adrenergic subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* **196**:357-361.

26. Yatani A, Imoto Y, Codina J, Hamilton S L, Brown A M y Birnbaumer L (1988) The stimulating G-protein of adenylyl cyclase, G_s , also stimulating dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **263**:9887-9895.
27. Morrow A L y Creese I (1986) Characterization of α_1 adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of 3H -WB4101 and 3H -prazosin binding. *Mol Pharmacol* **29**:321-330.
28. Gross G, Hanft G y Rugevics C (1989) Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the α_1 adrenoceptor. *Eur J Pharmacol* **151**:333-335.
29. Boer R, Grassegger A, Schudt C H y 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.
30. Minneman K P (1988) α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol Rev* **40**:523-530.
31. Michel A D, Loury D N y Whiting R L (1989) Identification of a single α_1 -adrenoceptor corresponding to the α_{1A} -subtype in rat submaxillary gland. *Br J Pharmacol* **98**:883-889.
32. Muramatsu I, Ohmura T, Kigoshi S, Hashimoto S y Oshita M (1990) Pharmacological subclassification of α_1 -adrenoceptors in vascular smooth muscle. *Br J Pharmacol* **99**:197-201.
33. Muramatsu I, Kigoshi S y Ohmura T (1991) Subtypes of α_1 -adrenoceptors involved in noradrenaline-induced contractions of rat thoracic aorta and dog carotid artery. *Jpn J Pharmacol* **57**:535-544.
34. 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 y 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.
35. Rokosh D G, Bailey B A, Stewart A F R, Karns L R, Long C S y 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.

36. Pérez D M, Piascik M T y 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.
37. Berridge M J y Irvine R F (1989) *Nature* **341**:197-205.
38. Slivka S R, Meier K E y Insel P A (1988) *J Biol Chem* **263**:12242-12246.
39. Burch R M, Luini A, Mais D E, Corda D, Vanderhoek J Y, Kohn L D y Axelrod J (1986) *J Biol Chem* **261**:11236-11241.
40. Bylund D B (1985) Heterogeneity of α_2 -adrenergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **22**:835-843.
41. Nahorski S R, Barnette D B y Cheung Y D (1985) Alpha-adrenergic receptor effector coupling: affinity states or heterogeneity of the alpha-2 adrenergic receptor?. *Clin Sci* **68**(Suppl.10):39s-42s.
42. Petrash A C y Bylund D B (1986) Alpha-2 adrenergic receptor subtypes indicated by [³H] yohimbine binding in human brain. *Life Sci* **38**:2129-2137.
43. Bylund D B (1988) Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* **9**:356-361.
44. Young P, Berge J, Chapman H y Cawthorne M A (1989) Novel α_2 -adrenoceptor antagonists show selectivity for α_{2A} and α_{2B} -adrenoceptors subtypes. *Eur J Pharmacol* **168**:381-386.
45. Bylund D B y Ray-Prenger C (1989) Alpha-2A and Alpha-2B adrenergic receptor subtypes: attenuation of cyclic AMP production in cell lines containing only one receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther* **251**:640-644.
46. Bylund D B, Eikenberg D C, Hieble J P, Langer S Z, Lefkowitz R J, Minneman K P, Molinoff P B, Ruffolo JR R R y Ullrich Trendelenburg (1994) IV International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol Rev* **46**:121-135.
47. Aghajanian G K y Vandermaelen C P (1982) *Science* **215**:1394-1396.
48. Holz IV G G, Rane S G y Dunlap K (1986) *Nature* **319**:670-672.
49. Isom L L, Cragoe E J y Limbird L E (1987) *J Biol Chem* **262**:6750-6757.

50. Michel M C, Brass L F, Williams A, Bokoch G M, LaMorte V J y Motulsky H J (1989) *J Biol Chem* **264**:4986-4991.
51. Cotecchia S, Kobilka B K, Daniel K W, Nolan R D, Lapetina E Y, Caron M G, Lefkowitz R J y Regan J W (1990) *J Biol Chem* **265**:63-69.
52. Hulme C E (1992) *Receptor-Ligand Interactions A Practical Approach*. IRL Press First Edition 458 pp.
53. Burt D R (1980) *Basic Receptor Methods II. Problems of Interpretation in Binding Studies. Short Course Syllabus "Receptor Binding Techniques"*. Society for Neuroscience Cincinnati Ohio November 8-9.
54. Bylund D B (1980) *Analysis of Receptor Binding Data. Short Course Syllabus "Receptor Binding Techniques"*. Society for Neuroscience Cincinnati Ohio November 8-9.
55. Scatchard G (1949) *Attractions of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci* **51**:660-672.
56. Rosenthal H E (1967) *Graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. Anal Biochem* **20**:525-532.
57. Lum K B B, Lau Y-S, Buesa R, Lockwood H R, y Kuo S-H (1980) *Studies on the hyperglycemia and hepatic glycogenolysis produced by alpha and beta adrenergic agonists in the cat. Life Sci* **26**:1195-1202.
58. Kuo S-H, Kamaka J K y Lum K B B. *Adrenergic receptor mechanisms involved in the hyperglycemia and hyperlacticacidemia produced by sympathomimetic amines in the cat. J Pharmacol Exp Ther* **202**:301-309.
59. Arribas S, Galvan R, Ferrer M, Herguido M J, Marin J y Balfagon G (1991) *Characterization of the subtype of presynaptic alpha2-adrenoceptors modulating noradrenaline release in cat and bovine cerebral arteries. J Pharm Pharmacol* **43**(12):855-859.
60. Karasawa Y y Koss M C (1993) *Distribution of neurally activated postjunctional adrenoceptors in cat forelimb vasculature. J Cardiovasc Pharmacol* **22**(4):594-599.
61. Karasawa Y y Koss M C (1993) *Postjunctional alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in cat forepaw vasculature. Jpn J Pharmacol* **62**(2):211-214.
62. Wang J Y, Don J J, Liu K H y Chen H I (1993) *Chin J Physiol* **36**(2):71-78.

63. García-Sáinz J A, Romero-Avila M T, Alcántara-Hernández R, Macías-Silva M, Olivares Reyes A y González-Espinosa C (1992) Species Heterogeneity of Hepatic α_1 -Adrenoceptors: α_{1A} -, α_{1B} - And α_{1C} -Subtypes. *Biochem Biophys Res Comm* **186**(2):760-767.
64. Price D T, Lefkowitz R J, Caron M G, Berkowitz D y Schwinn D A (1993) Localization of mRNA for Three Distinct α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes in Human Tissues: Implications for Human α_1 -Adrenergic Physiology. *Mol Pharmacol* **45**:171-175.
65. García-Sáinz J A, Romero-Avila M T y Tórres-Márquez M E (1995) Characterization of the human liver α_1 -adrenoceptors: predominance of the α_{1A} subtype. *Eur J Pharmacol* (En Prensa).
66. García-Sáinz J A, Casas-González P, Romero-Avila M T y González-Espinosa C (1994) Characterization of the hepatic α_{1B} -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci* **54**(25):1995-2003.
67. Gutiérrez-Venegas G y García-Sáinz J A (1993) Characterization of the α_{1B} -adrenergic receptors of chicken hepatocytes. Signal transduction and actions. *Comp Biochem Physiol* **106C**(3):797-803.
68. García-Sáinz J A, Olivares-Reyes J A, Macías-Silva M y Villalobos-Molina R (1995) Characterization of the α_{1B} -Adrenoceptors of Catfish Hepatocytes: Functional and Binding Studies. *Gen Comp Endocrinol* (En Prensa).
69. Neville D M Jr (1968) Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim Biophys Acta* **154**:540-552.
70. Loten G E y Redshaw-Loten C J (1986) Preparation of rat liver plasma membranes in a high yield. *Anal Biochem* **154**:183-185.
71. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L y Randall R J (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
72. McPherson A G (1985) Kinetic, EBDA, Ligand, Lowry. A Collection of Radioligand Binding Analysis Programs. Elsevier Science Publishers BV UK 127 pp.
73. Cheng Y C y Prusoff W F (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.

74. García-Sáinz J A, Romero-Avila M T, Villalobos-Molina R y Minneman P K (1995) α_1 -Adrenergic subtype selectivity of tamsulosin: studies using livers from different species. *Eur J Pharmacol* (En Prensa).

75. Perez D M, De Young M B y Graham R M (1993) Coupling of the expressed α_{1B} and α_{1D} -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cells type specific. *Mol Pharmacol* **44**:784-794.

76. García-Sáinz J A y Macías-Silva M (1995) Species heterogeneity of liver α_1 -adrenoceptors: subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol Commun* **6**:53-60.

77. Arias I, Popper H, Schachter D y Shafritz D A (1982) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven press New York.

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