



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

CAMPUS IZTACALA  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

BO 1266/96  
Ej. 3

“EFECTO DE LA CLOROQUINA Y LA PRIMAQUINA EN  
LA ACCION  $\alpha_1$  ADRENERGICA”

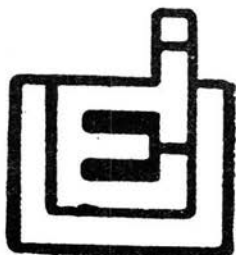
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A N :

**ARTEMIO MENDOZA MENDOZA**



Los Reyes Iztacala, Edo. de Méx.

1996



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Jesus Adolfo García Sáinz Con apoyo del CONACyT la DGA y la Fundación UNAM.

Con todo amor a mis padres. Por todo lo que representan para mí. De quienes he aprendido que para conseguir lo que se anhela hay que luchar incansablemente y nunca ceder.

A mis hermanos: Moises, Leandro, Laura, Maricela y Elizabeth con el mismo cariño que me han brindado siempre. Por todos esos momentos compartidos y porque siempre me han consentido mucho.

A Fernando Daniel y Rebeca por el amor bonito que solo un niño puede dar.

A mis amigos, porque me han ayudado a salir a flote en esos momentos Artemiescos. Porque sin mencionarlos se que estan siempre conmigo.

## Agradecimientos:

Al pueblo mexicano, porque gracias a él, he logrado estudiar en esta mi Universidad.

Al Dr. J.A. García Sáinz, mi más sincero agradecimiento por haber dirigido este trabajo de investigación y sobre todo por tenerme toda la paciencia del mundo.

Al Biol. Francisco López Galindo y al Dr. Rafael Moreno Sánchez, por todos los consejos dados y motivarme a seguir adelante.

A todos los profesores de la ENEP Iztacala, por todas las enseñanzas recibidas.

A mis sinodales por haber revizado mi trabajo de tesis.

Al Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, Marina Macías, Patricia Casas, María Teresa Romero, Rocío Alcántara, Alberto Olivares, José Vázquez y Luz del Carmen Medina, porque gracias a ustedes pude hacer realidad el presente trabajo. Gracias por la ayuda prestada.

A Claudia González Espinosa, por haberme enseñado toda su sapiencia en Biología Molecular, y por todos esos consejos siempre oportunos. Gracias.

A todos mis compañeros del laboratorio: Paty Casas, Rocío Alcántara, Alberto Olivares, Claudia González, Tere Romero, Diana González, Erick Hernández, Agustín García, Marina Macías, Luz del Carmen Medina, José Vázquez, Rafael Villalobos, Mario Cruz, gracias por hacer siempre agradable mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos de la Prepa 9: Edgar, Mario, German, Rodolfo, Omar, Isabel, Efraín, Víctor Manuel y Lorena. Por todos esos momentos que vivimos juntos y por nuestra amistad.

A Rafael Avila Flores, Natalia Manzano León, Daniel García Morales, Gloria Hernández Alcántara y Rocío Burgoa Gutierrez por la amistad que nos une y por todo lo que hemos pasado y pasaremos juntos.

A mis compañeros del grupo 91: Natalia, Teresa, Isabel, Carmen, Cynthia, Miriam, Patricia, Gabriela, Rebeca, Alejandra, Alberto, Rafael, Yuri, Alonso, César, Heliot, Rocío y Mónica. Por compartir conmigo su nerdismo.

A Martha Fregoso, Eduardo Barrera e Irma Padilla, así como a todos los demás del laboratorio de Metodología Científica I y II.

A las familias: Avila Flores, León, Palacios, Cerón Coria, Refugio Olarte y Chiu Rivera por haberme brindado siempre su amistad y estar siempre dispuestos a ayudarme.

## INDICE

INDICE.....	I
ABREVIATURAS.....	III
I. INTRODUCCION	
1.- Comunicación celular.....	1
Comunicación endocrina.....	1
Comunicación paracrina.....	2
Neurotransmisión.....	2
Neurosecreción.....	2
Comunicación yuxtacrina.....	2
Comunicación autócrina.....	2
2.- Mensajeros celulares.....	3
3.- Receptores.....	5
3.1 Receptores intracelulares.....	6
3.2 Receptores tipo canal.....	6
3.3 Receptores con actividad enzimática.....	6
3.4 Receptores acoplados a proteínas G.....	7
3.4.1 Proteínas G.....	8
3.4.1.1 Activación de proteínas G.....	8
3.4.2 Sistema de transducción de receptores acoplados a proteínas G.....	10
Sistema de la adenilato ciclasa.....	10
Sistema del recambio de fosfoinosítidos-calcio.....	11
3.4.3 Receptores adrenérgicos.....	14
3.4.3a Receptores $\beta$ adrenérgicos.....	15
3.4.3b Receptores $\alpha_2$ adrenérgicos.....	15
3.4.3c Receptores $\alpha_1$ adrenérgicos.....	16
3.4.3c.1 Estructura.....	17
3.4.3c.2 Regulación de la señal $\alpha_1$ adrenérgica.....	20
II. ANTECEDENTES.....	21
III OBJETIVO GENERAL.....	24
IV MATERIAL Y METODOS.....	25
Material biológico.....	25
Químicos.....	25
Obtención de hepatocitos.....	25
Cuantificación de la actividad de la fosforilasa <i>a</i> .....	25



**Indice II**

Obtención de membranas de hígado de rata.....	26
Saturación.....	26
Competencia.....	26
Recambio de fosfoinosítidos.....	27
Inositol (1,4,5) trisfosfato.....	27
Determinación de los ensayos de competencia y saturación.....	28
V RESULTADOS y DISCUSION.....	29
VI CONCLUSIONES.....	44
VII PERSPECTIVAS.....	45
X BIBLIOGRAFIA.....	46

## ABREVIATURAS

<b>AMPC</b>	Adenosin 3,5 monofosfato cíclico
<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ATP</b>	Adenosin 5'-trifosfato
<b>βARK</b>	β Adrenergic Receptor Kinase
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>Gα</b>	Subunidad alfa de las proteínas G
<b>Gβγ</b>	Complejo beta-gama de las proteínas G
<b>GDP</b>	Guanosin 5'-difosfato
<b>Gi</b>	Proteína G cuya subunidad alfa inhibe a la adenilato ciclasa
<b>Gq</b>	Proteína G cuya subunidad alfa estimula a la fosfolipasa C
<b>Gs</b>	Proteína G cuya subunidad alfa estimula a la adenilato ciclasa
<b>GTP</b>	Guanosin 5'-trifosfato
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración a la cual se inhibe el 50 % de la unión de un ligando.
<b>IP<sub>3</sub></b>	myo-inositol 1,4,5 trisfosfato
<b>Ki</b>	Constante de inhibición. Constante de disociación en el equilibrio.
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleótido.
<b>PPi</b>	Pirosfosfato
<b>PKA</b>	Protein Kinase A
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PKG</b>	Protein Kinase G
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PQ</b>	Primaquina
<b>Proteínas G</b>	Proteínas que unen nucleotidos de guanina
<b>PMA</b>	Phorbol-12 miristato-13 acetato.

## I. INTRODUCCION.

Sin lugar a dudas todo sistema biológico tiene la capacidad de comunicarse con su medio, de tal forma que cuando cesa esta comunicación, o simplemente no se da, el sistema sufre desajustes que lo pueden llevar a la extinción. Por ello, la relación ambiente-sistema biológico es tan estrecha que es imposible concebir a un organismo aislado de su medio.

Los sistemas biológicos responden a estímulos ambientales a través de cambios internos que permiten su subsistencia. Este grado de "plasticidad" de los sistemas vivos es el que determina en un momento dado su permanencia en el medio.

La célula, el sistema biológico fundamental, es capaz de percibir cambios en el ambiente y modificar su fisiología para "adaptarse" a las nuevas condiciones. La forma de percibir esos cambios es a través de estructuras especializadas que reciben el estímulo y lo transforman en una respuesta celular. Por otro lado, un organismo pluricelular que requiere llevar una amplia variedad de actividades involucra la participación de cada uno de sus constituyentes. La coordinación de cada una de sus células esta dada por un intenso proceso de comunicación celular, un diálogo continuo entre las diferentes unidades constitutivas.

### 1. Comunicación celular.

La comunicación celular manifiesta una amplia gama de variedades. Sin embargo, una de las más importantes es la comunicación química. Está involucra a sustancias químicas que sirven como mensajeros entre las células. Actualmente se conocen por lo menos seis variantes de comunicación celular química:

- a) En la *comunicación endocrina*, las células de las glándulas de secreción interna liberan sus hormonas al torrente sanguíneo, para que estas actúen en grupos distantes de células blanco. Las hormonas son específicas, ya que se dirigen únicamente a células con capacidad de percibir su

presencia (1). Fig 1a.

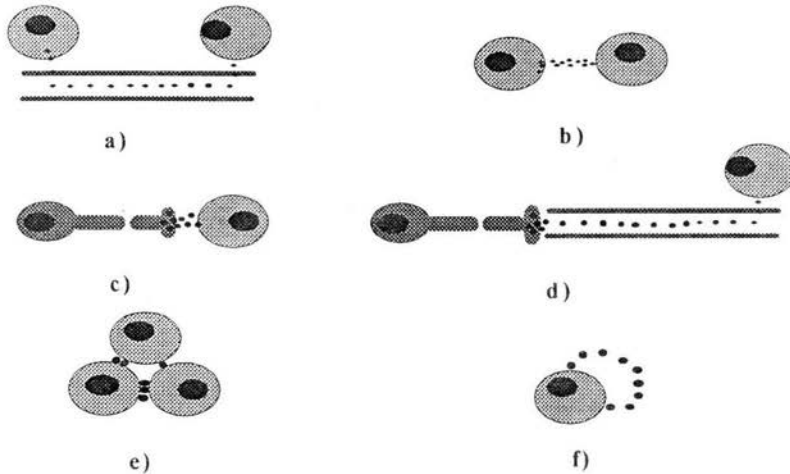
b) La *comunicación paracrina*, es de tipo local debido a que se lleva a cabo entre células contiguas. Las señales secretadas por las células que manifiestan este tipo de comunicación no difunden tan lejos, por esta razón son rápidamente captadas por las células vecinas (1-3). Fig 1b.

c) La *neurotransmisión*, es un tipo de comunicación que se da con la participación de células nerviosas; algunos autores la consideran como un tipo de comunicación parácrina, debido a la cercanía entre las células participantes (3). Sin embargo, otros la consideran como un tipo especial de comunicación dado que el contacto de las terminales nerviosas con su(s) célula(s) blanco se da por uniones celulares especializadas, llamadas *sinapsis química*, la cual asegura que el neurotransmisor sea liberado rápida y específicamente a la célula blanco postsináptica. (1,2). Fig 1c.

d) La *neurosecreción*, es una mezcla de la comunicación endocrina y neurotransmisión. En este caso, una célula formada a partir del tejido nervioso secreta su mensaje a la circulación, la neurohormona viaja en el torrente sanguíneo para interactuar con las células blanco (1). Fig 1d.

e) Un tipo interesante de comunicación química, es la *yuxtácrina*, en la cual existen moléculas ancladas a la cara externa de la superficie celular que hacen contacto con los receptores de membrana plasmática de una célula vecina. A diferencia de los otros tipos de comunicación, la señal está anclada y no difunde al medio. Fig 1e.

f) En la comunicación *autocrina*, la célula responde a sustancias que ella misma libera. (1,3). Albert *et al.* consideran que la comunicación autocrina es más efectiva cuando se da simultáneamente por células vecinas del mismo tipo, esto puede ser usado para estimular a un grupo de células idénticas para que tengan una misma decisión de desarrollo en un momento determinado. Fig 1f.



**Figura.1.** Variantes de la comunicación celular. a) Comunicación endocrina; b) Comunicación paracrina; c) neurosecreción; d) neurotransmisión; e) comunicación yuxtácrina; f) comunicación autocrina.

## 2. Mensajeros celulares

Los mensajeros celulares de origen químico son muy diversos pero pueden resumirse en tres:

Algunos son de naturaleza *peptídica*, como la insulina, el glucagón, la angiotensina II, las endorfinas, los factores de crecimiento, etc. Los receptores que reconocen a estas hormonas son capaces de discernir entre péptidos con un aminoácido de diferencia, lo que demuestra el grado de selectividad por parte de los receptores. Fig 2a.

Existen hormonas como las catecolaminas, que tienen en su estructura grupos *amino*. Las catecolaminas (como la adrenalina o epinefrina y noradrenalina o norepinefrina) son compuestos cuya estructura principal es la feniletilamina, con grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático, éstas tienen su origen en el metabolismo de los aminoácidos (5); de igual manera existen

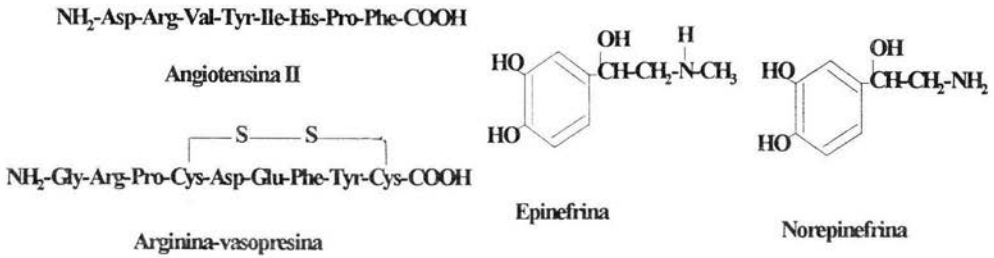
algunos aminoácidos como el glutámico, el aspártico y la glicina que son mensajeros químicos con un grupo amino (1,3,4). Fig 2b.

Un tercer grupo de hormonas corresponde a los de naturaleza *lipídica*. A este tipo corresponden los esteroides, y los eicosanoides. Los esteroides presentan como característica estructural, un sistema anular tetracíclico. Los esteroides son sintetizados en diversas glándulas a partir del colesterol. Dentro de este grupo están las hormonas sexuales masculinas y femeninas (1,2). Los eicosanoides son moléculas que generalmente actúan de modo autócrino, en los mamíferos adultos. Su síntesis tiene como origen al ácido araquidónico. A este grupo pertenecen las prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina. Fig 2c.

Algunas hormonas lipofílicas como los esteroides atraviesan la membrana plasmática e interaccionan con receptores intracelulares localizados en el núcleo o en citosol. Estos mensajeros forman complejos con el receptor correspondiente e interaccionan con secuencias reguladoras y específicas del DNA, para modular la transcripción de algunos genes. Los complejos hormona-receptor también modifican la estabilidad de RNA mensajeros específicos. (2,4).

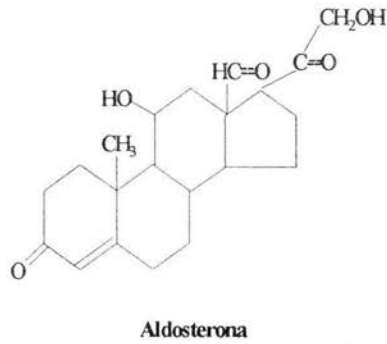
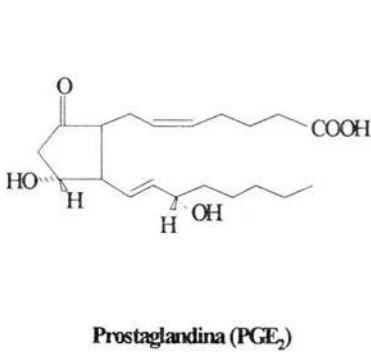
Aquellos mensajeros que no atraviesan la membrana plasmática (como los de naturaleza peptídica, los que tienen grupos amino y algunos eicosanoides, estos últimos debido a la presencia de muchos grupos hidroxilo en su estructura) son reconocidos por receptores localizados en la superficie celular. Los procesos de transducción, es decir la conversión de un tipo de señal externa a una interna, y de amplificación de la señal, se da de manera distinta dependiendo del tipo de receptor involucrado en el reconocimiento de la señal.

Por lo general aquellas hormonas cuyo receptor se localiza intracelularmente presentan efectos de larga duración, que van de algunas horas hasta varios días. Por el contrario, las hormonas cuyo receptor está expuesto en la membrana plasmática manifiestan su respuesta de milisegundos a pocos minutos (2), aunque también tienen efectos de larga duración.



a) HORMONAS PEPTIDICAS

b) HORMONAS CON GRUPOS AMINO



c) HORMONAS LIPOFILICAS

Figura 2. Tipos de hormonas químicas

3. Receptores.

Los receptores son proteínas capaces de reconocer estereoespecíficamente a los mensajeros celulares, y de iniciar la secuencia de eventos que constituyen una respuesta celular. Esta característica es distintiva de los receptores, ya que existen proteínas que pueden reconocer al mensajero con alta especificidad, pero no conducen respuesta celular alguna.

Los receptores se identifican por la hormona que reconocen. Así, podemos reconocer receptores para adrenalina, receptores para histamina, receptores para el factor de crecimiento epidérmico, etc. Aunque generalmente se piensa que una hormona está definida para un solo receptor, lo más frecuente es que existan una variedad de receptores que tienen la capacidad de reconocer a una sola hormona. De tal forma que actualmente se conocen nueve subtipos de receptores para la adrenalinina; tres para histamina; cinco para acetilcolina, etc. (6).

Los receptores no solo se pueden clasificar por la señal que reconocen, sino también por su actividad y localización celular. De tal suerte que se les puede clasificar como:

**3.1. Receptores intracelulares.** - este tipo de receptores se localizan en el citoplasma y en el núcleo. Las hormonas que los activan son lipofílicas de tal suerte que pueden atravesar la membrana plasmática. Entre las hormonas que activan a este tipo de receptores están los glucocorticoides, hormonas sexuales y la vitamina D. (1).

**3.2. Receptores tipo canal.** - Los receptores tipo canal por lo general están constituidos por varias subunidades. Estos receptores tienen un sitio para la interacción de la hormona así como sitios que constituyen propiamente el canal. Este último tiene la capacidad de abrirse o modificarse cuando se produce la interacción hormona-receptor. El receptor nicotínico de la acetil colina, que modula la permeabilidad al sodio, así como el del GABA del tipo A, que modula la permeabilidad al cloruro; son los receptores tipo canal más caracterizados. (1,7,8).

**3.3. Receptores con actividad enzimática.** - Se han descrito tres modalidades de receptores con actividad enzimática: los que tienen actividad de *cinasa*, los que la tienen de *proteína fosfatasa* y aquellos que tienen actividad de *guanilato ciclasa*. Estos receptores pueden estar constituidos por una o varias subunidades.

Los receptores con actividad de *proteína cinasa* se caracterizan por presentar el dominio de unión de la hormona en la región extracelular y el dominio catalítico en el espacio intracelular. Este tipo de receptores pueden ser de dos tipos dependiendo del residuo que fosforilan, los que fosforilan en



residuos de tirosina y los que fosforilan en serina/treonina. (1).

En el proceso de transducción de los receptores con actividad de cinasa hay una autofosforilación como paso inicial, después de ello se llevan a cabo las fosforilaciones de las proteínas efectoras involucradas en el sistema. A este tipo de receptores corresponden el de la insulina, el del factor de crecimiento epidérmico, el del factor de crecimiento derivado de plaquetas, etc.

Por otro lado, existen proteínas membranales que tienen *actividad de tirosina fosfatasa*, y que se asemejan a los receptores de Factores de crecimiento. Las fosfatasas de tirosina-fosfato más conocidas están formadas por una sola cadena polipeptídica con una gran porción extracelular, una zona transmembranal y una porción intracelular. En esta última se localizan por lo general dos regiones con actividad catalítica (1,9,10). El prototipo de este grupo es la proteína CD45, una glucoproteína transmembranal de las células hematopoyéticas (10).

Dentro de los receptores con *actividad de guanilato ciclasa* se encuentra el receptor para el factor natriurético auricular. Este receptor está constituido por una sola cadena polipeptídica, distribuida espacialmente en la célula por una región extracelular, donde se fija el factor natriurético auricular, una zona intermembranal, y la zona intracelular, que contiene la parte catalítica. Cuando se activa este receptor, provoca como respuesta principal la producción de GMP cíclico, el cual va a activar a la proteína cinasa dependiente de GMP cíclico (PKG), la cual enciende una cascada de fosforilaciones que son las responsables de la mayoría de los efectos fisiológicos del factor (1).

**3.4. Receptores acoplados a proteínas G.** La superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (proteínas con capacidad de unir nucleótidos de guanina) comprende receptores de una sola cadena polipeptídica de siete dominios transmembranales, unidos por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares. La porción amino terminal de estos receptores se localiza en la región extracelular y el carboxilo terminal en la región intracelular. Estos receptores presentan sitios de glucosilación en la porción amino terminal, por lo que son considerados como glucoproteínas. (11).

Las proteínas G son una compleja y diversa familia de proteínas homólogas, que acoplan un amplio número de receptores a una variedad de proteínas efectoras ( proteínas blanco moduladas por proteínas G o por los receptores con actividad enzimática) (12).

Por lo general los sistemas de transducción de los receptores acoplados a proteínas G involucran al receptor correspondiente, una o más proteínas G , una o más proteínas efectoras, y uno o más segundos mensajeros.

Debido a que el presente trabajo se llevó a cabo en un sistema de transducción que involucra un receptor acoplado a proteínas G, es necesario hacer una breve descripción de estas.

### **3.4.1 Proteínas G.**

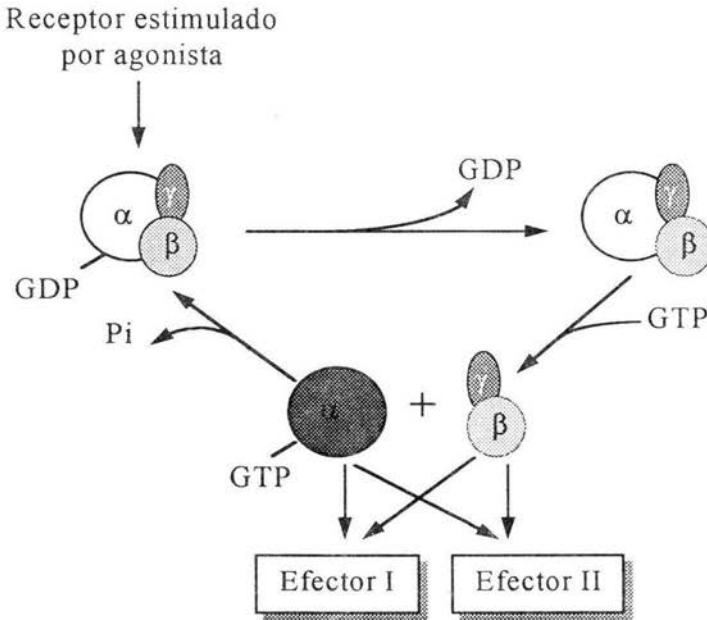
Las proteínas G son heterotrímeros, constituidas por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . (12,13) La subunidad  $G_{\alpha}$  tiene una masa molecular de 39-46 kDa y manifiesta actividad de GPMAsa (14), la subunidad  $G_{\beta}$  tiene una masa molecular de  $\approx 37$  kDa y la subunidad  $G_{\gamma}$  pesa  $\approx 8$  kDa. Estas dos subunidades ( $G_{\beta}$  y  $G_{\gamma}$ ), existen como un complejo altamente afin, que funciona como unidad ( $G_{\beta\gamma}$ ) (13).

En mamíferos por lo menos se han descrito 20 subunidades  $G_{\alpha}$ , 5  $G_{\beta}$  y 6  $G_{\gamma}$  (13, 15). De acuerdo al tipo de  $G_{\alpha}$ , las proteínas G se han clasificado en cuatro subfamilias, representadas por  $G_s, G_i, G_q$  y  $G_{12}$ . Actualmente se sabe que tanto las subunidades  $G_{\alpha}$  como los complejos  $G_{\beta\gamma}$  participan en la modulación de diferentes proteínas efectoras (12,13 y 15).

#### **3.4.1.1. Activación de las proteínas G**

En estado basal la subunidad  $G_{\alpha}$  contiene unido GDP, y la asociación  $G_{\alpha}$  y el complejo  $G_{\beta\gamma}$ , es altamente favorecido. La interacción hormona-receptor provoca cambios conformacionales del receptor que permiten la interacción de este con la proteína G. Cuando los receptores forman un

complejo con las proteínas G provocan cambios en las propiedades del receptor y de la proteína G, estos cambios son el incremento en afinidad del receptor por la hormona o agonista (11, 15), y una mayor velocidad de disociación del GDP y mayor unión del GTP hacia  $G_{\alpha}$ . El complejo  $G_{\alpha}$ -GTP se disocia del receptor y del complejo  $G_{\beta\gamma}$ . Las subunidades  $G_{\alpha}$  y  $G_{\beta\gamma}$  libres regulan la actividad de diversas proteínas efectoras (adenilato ciclasa, fosfolipasas, canales iónicos, proteínas cinasas, etc), hasta que el GTP es hidrolizado a GDP. Cuando sucede la hidrólisis del GTP, el complejo  $G_{\alpha}$ -GDP se reasocia con el complejo  $G_{\beta\gamma}$  (11,12,14-17). Fig 3.



**Figura 3** Ciclo de activación de las proteínas G. Según Neer, 1995.

Algunas toxinas bacterianas con actividad enzimática, como la toxina del cólera y la toxina pertusis, atraviesan la membrana celular y en el citosol catalizan la adición covalente del grupo ADP-ribosil del  $NAD^+$  intracelular a algunas subunidades  $G_{\alpha}$  de las proteínas G, provocando la reducción en la actividad GPMasa (2,18). Actualmente se conoce la selectividad de estas toxinas

hacia cierto grupo de proteínas G. La toxina del cólera ADP-ribosila a las proteínas que activan a la adenilato ciclasa (Proteínas  $G_s$ ); la toxina pertusis ADP-ribosila a las proteínas que inhiben a la adenilato ciclasa (proteínas  $G_i$ ), mientras que las proteínas  $G_q$  (que activan a la Fosfolipasa C), son insensibles a estas toxinas, de ahí que se ha empleado esta característica para diferenciar la participación de las diferentes proteínas G en los sistemas de transducción. Sin embargo, en algunos tejidos, la toxina pertusis inhibe la activación de la fosfolipasa C, sugiriendo que una proteína como la  $G_i$  mas que un miembro de la subfamilia  $G_q$  esta involucrada en esta vía (14). No obstante, Taylor *et al.* en 1990 (19), aislaron de hígado de rata, a las proteínas  $G_q$  y  $G_{11}$  como miembros de la familia  $G_q$ .

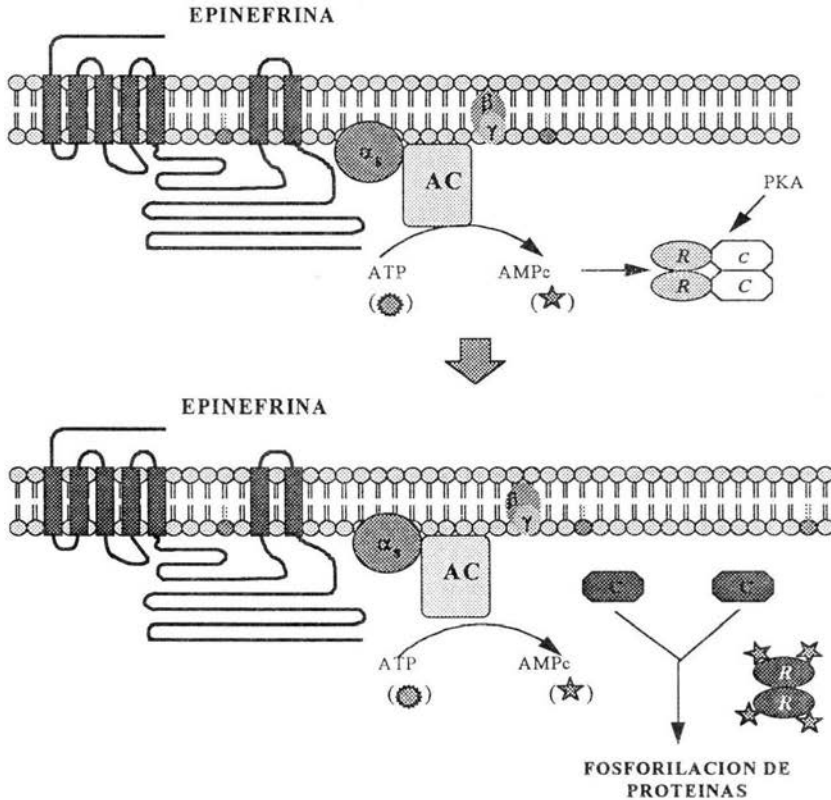
### 3.4.2. Sistemas de transducción de receptores acoplados a proteínas G.

Los sistemas de transducción mejor conocidos son el de la adenilato ciclasa y el de recambio de fosfoinosítidos-calcio. A continuación describiré brevemente cada uno de ellos.

#### 3.4.2a. Sistema de la adenilato ciclasa.

Este sistema tiene como proteína efectora a la adenilato ciclasa, enzima capaz de producir AMP cíclico a partir de ATP, con la liberación de pirofosfato. El sistema puede estar regulado por dos subfamilias de proteínas G, las  $G_s$ , que estimulan a la adenilato ciclasa y las  $G_i$ , que inhiben a la enzima. La forma de modular a la enzima por  $G_i$  o  $G_s$  es básicamente el mismo, la diferencia es que cuando la  $G_{\alpha_i}$  interacciona con la adenilato ciclasa, esta se inhibe, caso contrario cuando hay interacción de  $G_{\alpha_s}$ -adenilato ciclasa, la enzima se activa.

El AMP cíclico generado es un modulador de la actividad de la proteína cinasa A (Proteína Cinasa dependiente de AMP cíclico), que es un tetrámero asimétrico constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. La unión de AMP cíclico a las subunidades reguladoras altera su afinidad por las subunidades catalíticas, provocando su disociación en un dímero de subunidades reguladoras-AMPcíclico y dos subunidades catalíticas en forma de monómero. La subunidad catalítica, promueve la fosforilación de varias proteínas (20), como la fosforilasa b cinasa, que participa en la glucogénesis (21). Fig. 4.



**Figura 4.** Sistema de activación de la adenilato ciclasa. AC (Adenilato ciclasa); R (subunidad reguladora); C (Subunidad catalítica); PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc).

### 3.4.2b. Sistema del recambio de fosfoinosítidos-calcio.

El recambio de fosfoinosítidos-calcio puede estar acoplado a sistemas que involucran la participación de proteínas G o a sistemas en los que participan receptores con actividad de tirosina cinasa (22,23). En el presente trabajo me referiré al sistema de fosfoinosítidos-calcio acoplado a proteínas G. Los componentes de esta vía son: un receptor de membrana, una proteína G, una fosfoinositidasa C (comunmente llamada Fosfolipasa C), segundos mensajeros (DAG, IP<sub>3</sub>, calcio) y receptores para IP<sub>3</sub>.

Por lo menos se sabe de 30 receptores acoplados a proteínas G, que provocan la liberación de calcio a través de la activación de fosfolipasa C. Entre aquellos, están los muscarínicos; purinérgicos, receptores de glucagón, de vasopresina, angiotensina II y los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, por solo mencionar algunos (22)

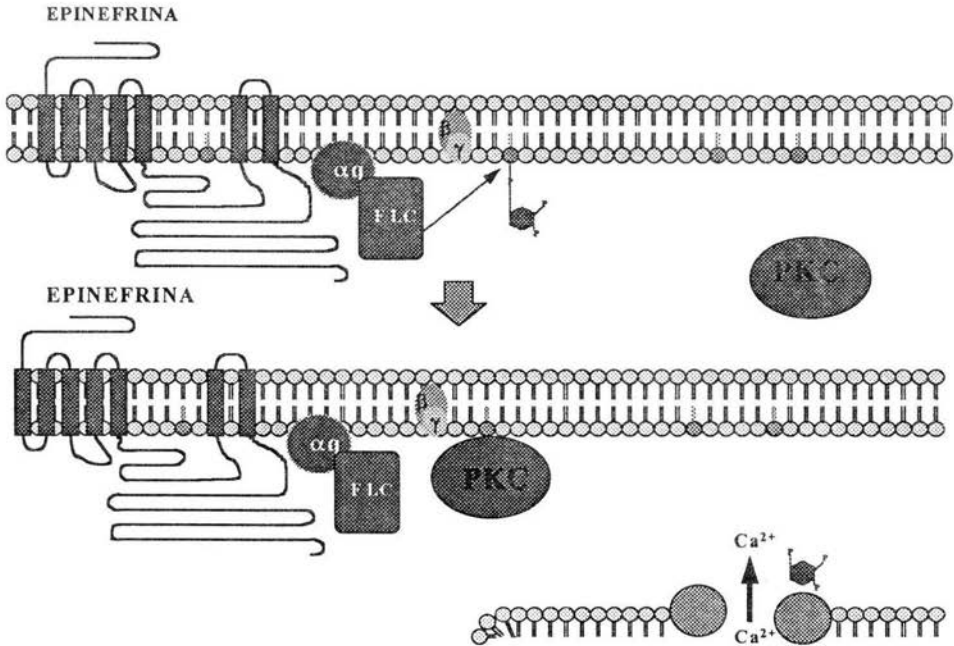
Por otro lado, la fosfolipasa C (PLC) en realidad es una familia diversa y compleja de proteínas, subclasificada como  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Sin embargo, solo la PLC- $\beta$  es sensible a proteínas G (Wu, et al., 1992 in 12). La PLC- $\beta_1$  es activada por algunas subunidades  $G_{\alpha q}$  ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha 11}$ ,  $G_{\alpha 14}$ ,  $G_{\alpha 16}$ ) mientras que la PLC- $\beta_2$  es activada solo por  $G_{\alpha 16}$  y quizás  $G_{\alpha 11}$  (Lee et al, 1992 in 12).

El sustrato de esta familia de fosfolipasas es el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato, que representa menos de 1% de los lípidos de membrana (25). La PLC hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato dando como productos inositol 1,4,5 trisfosfato (Ins (1,4,5) $P_3$ ) y diacilglicerol (DAG) (26). El Ins (1,4,5) $P_3$  es una molécula hidrosoluble que viaja hacia el citosol e interacciona con un receptor tipo canal localizado en la membrana de las pozas intracelulares de calcio (24). Esta interacción provoca la liberación de calcio de las pozas a través de la apertura del canal.

Se ha observado que la concentración de calcio intracelular, después de la estimulación de los receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos-calcio, sigue dos fases: la primera es la liberación de calcio de las pozas internas, y la segunda es la entrada de calcio del medio extracelular, por un mecanismo aún desconocido (27). Actualmente está en voga este punto, y la teoría más aceptada es la de entrada capacitativa de calcio. Esta teoría estipula que la entrada de calcio esta regulada por el estado de llenado de las pozas de calcio. Las pozas de calcio evitan la entrada de calcio cuando estas están llenas, pero inmediatamente empiezan a promover la entrada de calcio cuando las pozas son descargadas.

El calcio es un tercer mensajero que activa una serie de proteínas dependientes de calcio. Entre estas proteínas tenemos a la PKC (Proteína Cinasa dependiente de calcio y fosfolípidos), la cinasa de la fosforilasa  $\alpha$ , etc. El DAG por su parte parece permanecer en la membrana plasmática, donde interactúa directamente con la proteína cinasa C provocándole un incremento en afinidad hacia

el calcio y por tanto activandola (28). Fig 5.



**Figura. 5** Transducción de fosfoinosítidos-calcio. FLC (fosfolipasa C); PKC (proteína cinasa , dependiente de calcio).

Generalmente cuando se habla de PKC, nos referimos a una familia amplia y diversa de isoformas proteicas. Al menos se conocen 12 isoformas que han sido clasificadas en tres diferentes familias. Las cPKC convencionales ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ) que son calcio dependientes, y las nPKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\nu$ /L, t, m), insensibles a calcio, son reguladas por fosfolípidos, diacilglicerol y ésteres de forbol. Las aPKC ( $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$ ) son insensibles a diacilglicerol, ésteres de forbol y calcio (Nishuka, 1992 in 76).

Uno de los aspectos de mayor interés del estudio de la PKC ha sido su capacidad de modular la función de elementos participantes en los sistemas de transducción existentes, como los receptores,

proteínas G y efectores membranales (adenilato ciclasa, fosfolipasa C y algunos canales iónicos), en los que inhibe o potencia su actividad. Gran parte de los avances en la acción de la PKC ha sido gracias a la utilización de ésteres de forbol, que activan a la PKC. Uno de estos ésteres de forbol es el forbol 12-miristato 13 acetato (PMA).

### 3.4.3. Receptores adrenérgicos.

Los receptores adrenérgicos, son glucoproteínas de membrana que forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Farmacológicamente se han reportado 9 subtipos de receptores adrenérgicos, los cuales presentan diferencias en la afinidad para distintos ligandos. Los adrenoceptores, como también se les conoce, se clasifican en:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta$ . Actualmente, se han descrito 3 subtipos de receptores  $\alpha_2$ :  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ , al menos tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ :  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1C}$  y tres subtipos del  $\beta$ :  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  (29). Fig 6.

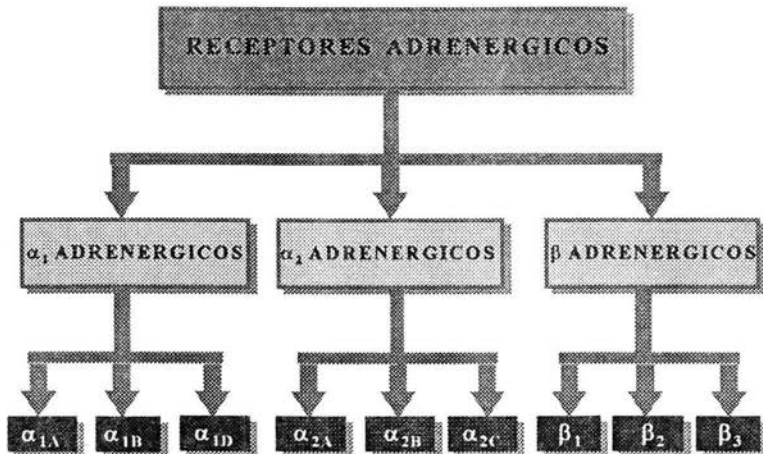


Figura 6.- Clasificación farmacológica de los receptores adrenérgicos



### 3.4.3a. Receptores $\beta$ adrenérgicos.

Los tres subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos pueden ser activados por epinefrina y norepinefrina, sin embargo, a diferencia de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ), las catecolaminas endógenas tienen diferentes afinidades para los subtipos  $\beta$  adrenérgicos. El receptor  $\beta_1$  adrenérgico es igualmente sensible a norepinefrina y a epinefrina, mientras que el receptor  $\beta_2$  adrenérgico es cien veces menos sensible a norepinefrina que a epinefrina. Ambos receptores son altamente sensibles al antagonista propranolol. El receptor  $\beta_3$  adrenérgico, por su parte, es menos sensible al propranolol y al menos para algunos sistemas es mucho más sensible a la noradrenalina que a la adrenalina. En la tabla I (según Bylund *et al.* 1994) se aprecia algunos de los agonistas y antagonistas empleados para distinguir farmacológicamente a los subtipos  $\beta$  adrenérgicos. Los tres receptores están acoplados al sistema de activación de la adenilato ciclasa a través de la proteína  $G_s$ . (30).

Tabla I. Agonistas (en cursivas) y antagonistas  $\beta$  adrenérgicos

AGENTE	$\beta_1$ (nM)	$\beta_2$ (nM)	$\beta_3$ (nM)
<i>Isoprenalina</i> ( $K_i$ )	14	21	-----
<i>Xamoterol</i> ( $K_i$ )	135	4533	-----
<i>Salbutamol</i> ( $EC_{50}$ )	810	26	2300
<i>BRL 37344</i> ( $EC_{50}$ )	680	35	1.7
Propranolol ( $K_B$ )	1	0.7	95
Atenolol ( $K_i$ )	125	1250	----
ICI 118551 ( $K_i$ )	710	4.6	----

### 3.4.3b. Receptores $\alpha_2$ adrenérgicos.

Los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos no presentan diferencias notables en la afinidad por los agonistas endógenos (adrenalina y noradrenalina). Sin embargo, pueden ser bloqueados de manera

diferencial por distintos antagonistas. La primer diferencia entre los receptores  $\alpha_{2A}$  y  $\alpha_{2B}$  adrenérgicos es que el primero es menos afin por la prazosina ( el cual originalmente se consideró antagonista selectivo para los  $\alpha_1$  adrenérgicos, aunque su afinidad es 5000 veces mayor para los  $\alpha_1$  que para los  $\alpha_2$  adrenérgicos); ambos receptores presentan una afinidad similar hacia la rauwolscina; asimismo, la oximetazolina es un agonista parcial que tiene una afinidad preferencial por el receptor  $\alpha_{2A}$  adrenérgico. El receptor  $\alpha_{2C}$  adrenérgico tiene propiedades farmacológicas similares al  $\alpha_{2B}$ , pero presenta una mayor afinidad por rauwolscina y BAM-1303. (30). En la tabla II, se hace referencia a algunos agonistas y antagonistas más empleados para identificar el tipo de receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos (según Bylun, *et al.* 1994).

Tabla II. Agonistas (en cursivas) y antagonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos

AGENTE	$\alpha_{2A}$ Ki (nM)	$\alpha_{2B}$ Ki (nM)	$\alpha_{2C}$ Ki (nM)
Rauwolscina	3.7±1.6	1.2±0.5	0.18±0.03
Prazosina	1034±403	30±7	61±17
ARC-239	256±86	4.6±2.0	51±28
BAM-1303	4.8±1	21±12	0.73±0.37
BRL-44408	3.6±1.9	174±30	0.73±0.37
<i>Oximetazolina</i>	<i>5.6±1.9</i>	<i>350±91</i>	<i>72±23</i>
Imiloxan	1750±1250	50±6	-----

### 3.4.3c. Receptores $\alpha_1$ adrenérgicos.

Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos son un grupo heterogeneo de receptores, que llevan a cabo una amplia gama de funciones fisiológicas y metabólicas, entre las que destacan la regulación de la gluconeogénesis y glucogenólisis en tejido hepático, crecimiento celular, y regulación del sistema nervioso simpático, entre otros procesos. (31).

Existen evidencias farmacológicas y de biología molecular de por lo menos tres subtipos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos :  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ . ( 29). Los receptores  $\alpha_{1A}$  adrenérgicos presentan alta afinidad por los agonistas metoxamina y oximetozalina y por los antagonistas WB 4104, fentolamina, 5-metilurapidil y (+)-niguldipina, pero son insensibles a alquilación por parte de la cloroetilclonidina. Este subtipo de receptores se encuentran distribuidos homogéneamente en hígado de ratón (32,33), hígado de conejo ( 32), y glándula submaxilar de rata (34).

El receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico tiene una afinidad más baja por los agentes antes mencionados y es sensible a cloroetilclonidina. En hígado y bazo de rata (32 y 35, respectivamente) existe una distribución homogénea de receptores  $\alpha_{1B}$  adrenérgicos. Por técnicas de clonación molecular y farmacología se ha descrito un tercer subtipo  $\alpha_1$  adrenérgico, el  $\alpha_{1D}$ . Este último se diferencia del  $\alpha_{1A}$ , porque tiene una menor afinidad por (+)-niguldipina, y metoxalina. En la tabla III, podemos ver algunos antagonistas y agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos. (según Bylund *et al.* 1994)

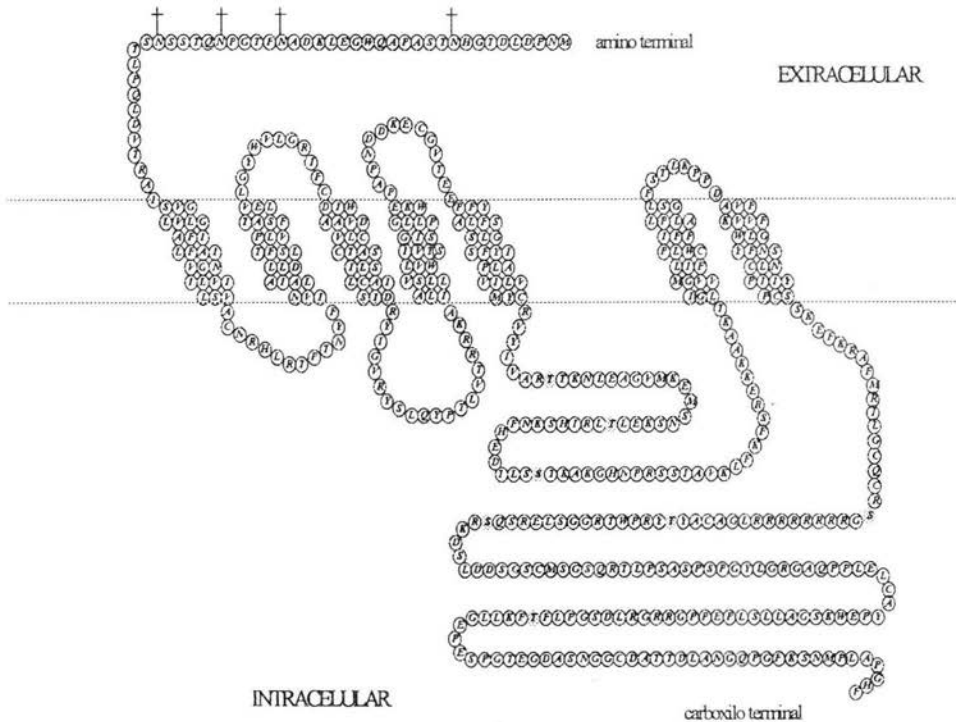
Tabla III. Agonistas (cursivas) y antagonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos.

AGENTE	$\alpha_{1A}$ Ki (nM)	$\alpha_{1B}$ Ki (nM)	$\alpha_{1D}$ Ki (nM)
WB4101	0.08±0.02	8.0±2.8	1.6±0.3
5-metilurapidil	0.70±0.1	96±26	15±0.4
Prazosina	0.13±0.02	0.32±0.09	0.32±0.01
<i>Oximetazolina</i>	3.7±0.83	280±56	2140
Espipirona	7.2 - 22	1.3±0.72	----

### 3.4.3c.1. Estructura.

Por análisis de hidropatía se ha llegado a establecer que en la región intermembranal de los receptores adrenérgicos existen entre 20- 25 aminoácidos que constituyen cada uno de los dominios

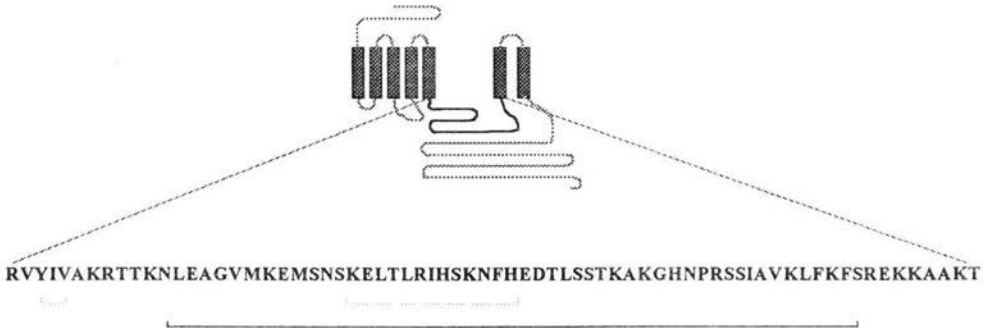
hidrofóbicos, estos están separados por residuos hidrofílicos (Fig 7). Los siete dominios hidrofóbicos son los más conservados entre los distintos subtipos de receptores, mientras que las regiones amino y carboxilo, así como la tercera asa intracelular, son las regiones más variables (35). Entre los miembros del mismo grupo ( $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1D}$ ) la identidad de los dominios transmembranales es usualmente entre 70-80 %, mientras que entre los distintos grupos ( $\alpha_1$  vs  $\alpha_2$ ;  $\alpha_2$  vs  $\beta$ , etc) esta identidad oscila entre 30-40 %. (36,37).



**Figura 7.** Modelo de la estructura del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico, clonado de una línea celular de hamster. Los aminoácidos sombreados representan los sitios potenciales de fosforilación por la PKC. (El esquema es según Lomasney *et al*, 1991 y los sitios probables de fosforilación según Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996.).

Uno de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos más estudiado es el  $\alpha_{1B}$ . Dianqing *et al.* (38) observaron que la secuencia comprendida entre los aminoácidos Lys<sup>240</sup> a His<sup>252</sup> y los residuos Tyr<sup>217</sup> a Val<sup>219</sup> son requeridos para la activación de la subunidad Ga<sub>q/11</sub>, mientras que los aminoácidos comprendidos

entre los residuos Asn<sup>226</sup> y Ser<sup>278</sup> se requieren para la activación de la G $\alpha_{14}$ . (36). Fig 8.



**Figura 8.** Representación esquemática de la secuencia de la tercera asa intracelular del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico. Las letras oscuras, representan las secuencias que se requieren para la activación de la G $\alpha_{q/11}$  y la línea continua abarca la secuencia necesaria para la activación de la G $\alpha_{14}$ .

La unión de los ligandos hacia el receptor se lleva a cabo en los residuos localizados en la región intermembranal. Actualmente se han localizado los aminoácidos que determinan el grado de afinidad de algunos agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos. Cuando se sustituye la Ala<sup>204</sup> por una valina y la Leu<sup>314</sup> por metionina, en el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico hay una alteración en el perfil farmacológico, cambiando a un tipo de farmacología  $\alpha_{1A}$  adrenérgico. Esto indica que los aminoácidos individuales, particularmente los de los dominios 5o y 6o transmembranal, son críticos para definir el grado de afinidad de algunos agonistas por parte de los receptores  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1A}$  adrenérgicos. (40).

En la región carboxilo terminal del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico existe una región rica en serinas y treoninas, que hacen un blanco perfecto para proteínas con actividad de serina/treonina cinasa. Lation *et al.* (39), observaron que está región esta crucialmente involucrada en la regulación del receptor por agonistas (proceso en el cual hay un desacoplamiento entre la proteína G y el complejo receptor-hormona). Este proceso de regulación (desensibilización) generalmente se asocia a una fosforilación del receptor y/o alguna otra proteína del sistema de transducción (41-43). Una observación de interés es que el receptor  $\alpha_{1D}$  carece de sitios consenso para la fosforilación por parte

de la proteína cinasa A (PKA), mientras que el receptor  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1A}$  contienen un sitio conservado para esta cinasa, en el tercer sitio transmembranal. Esto pudiera sugerir un mecanismo de regulación del receptor  $\alpha_{1D}$  distinto del  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1A}$  (36). En la figura 7 se señalan los posibles sitios de fosforilación de la PKC, para el receptor  $\alpha_{1B}$  de hamster (Según 44).

### 3.4.3c.2. Regulación de la señal $\alpha_1$ adrenérgica.

Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, se hayan acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, como vía principal de transducción. Sin embargo, la posibilidad de que los distintos subtipos  $\alpha_1$  adrenérgicos puedan estar ligados a diferentes vías de señal, dependiendo del tipo celular. En realidad, se conoce poco acerca del acoplamiento de estos receptores a otros sistemas, aunque hay trabajos que sugieren que los  $\alpha_1$  adrenérgicos se pueden acoplar a la  $PLA_2$  y PLD (31). Lo que está claro es que todos los  $\alpha_1$  adrenérgicos provocan la elevación de calcio intracelular. Esto con frecuencia se asocia con la liberación de calcio de pozas intracelulares, por un mecanismo que involucra la activación de la fosfolipasa C (PLC) a través de una proteína G.

La fosforilación del receptor por lo general se asocia al fenómeno de desensibilización, es decir, al mecanismo regulador que contribuye al mantenimiento de la actividad celular dentro de límites normales. Este mecanismo por lo general disminuye la función del receptor (45). La desensibilización está asociada a un cambio en la afinidad del receptor por la hormona, de tal manera que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos presentan dos estados de afinidad que parecen reflejar el acoplamiento de aquellos con la proteína G. El primero de estos estados es un complejo terciario de alta afinidad que consiste de un agonista, el receptor y la proteína G; este complejo se convierte en uno de baja afinidad cuando hay un intercambio de GTP por GDP y disociación de la proteína G activada. En hepatocitos de rata se ha observado que los ésteres de forbol convierten al receptor  $\alpha_1$  adrenérgico a un estado de baja afinidad (46,47), lo que sugiere la participación de la (PKC) en la inhibición de la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica.

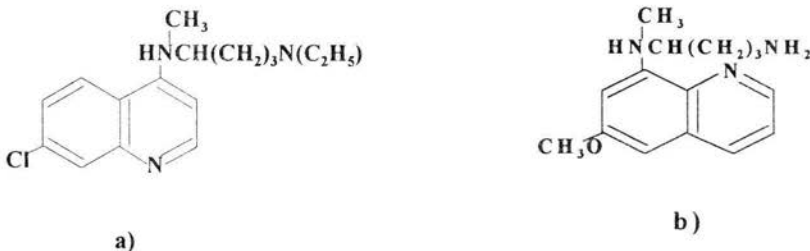
Se ha descrito en ensayos *in vitro* que la PKC y la PKA tienen la capacidad de fosforilar al receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico (41-42), sin embargo la norepinefrina incrementa la fosforilación del

receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico a través de la PKC, pero no a través de la PKA (43). Actualmente se ha descrito que la fosforilación del receptor  $\alpha_1$  adrenérgico también se lleva a cabo por una familia de cinasas que fosforilan a distintos receptores ( las  $\beta$ ARK's).

Por otro lado, se sabe que la internalización del complejo hormona-receptor a compartimentos vesiculares es una forma de reactivar a algunos receptores. Para el caso de los receptores  $\beta$  adrenérgicos se ha observado que el receptor fosforilado es reconocido por proteínas llamadas arrestinas, las cuales impiden el acoplamiento del receptor con la proteína G. Después de ello, ocurre la internalización del complejo hormona-receptor. En el compartimento vesicular hay una disociación ligando-receptor, lo que permite el reciclaje del receptor a la membrana plasmática y el transporte de los ligandos donde son degradados (48, 66).

## II. ANTECEDENTES

La primaquina y la cloroquina son bases débiles (Fig 9) que han sido ampliamente usadas como inhibidores del reciclaje de receptores secuestrados dentro del compartimento celular (49,50). Estos agentes lisosomotrópicos (término acuñado para designar a todas las sustancias que son capturados "selectivamente" en los lisosomas (77) ) y antimaláricos, representan una herramienta útil para determinar si hay reciclaje de los receptores o síntesis *de novo* de los mismos.



**Figura 9.** Estructura de la cloroquina (a) y de la primaquina (b).

Beeler & Cooper (46) utilizaron la primaquina (300  $\mu\text{M}$ ) para determinar el efecto de la PKC en

la internalización del receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico en hepatocitos de rata. En su estudio observan que el número de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos disminuye en un  $34.0 \pm 2.4 \%$ , cuando las células son tratadas con primaquina 15 minutos antes del estímulo.

Para el caso de la cloroquina, se ha observado que su efecto en el reciclaje de los receptores, depende del tipo celular. En células de hígado de Chang no hubo inhibición del reciclaje del receptor  $\beta_2$  adrenérgico, mientras que en células HeLa el efecto inhibitorio fue prominente. (51). Fyles *et al.* (52), utilizan cloroquina para inhibir el reciclaje de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos en células de islotes pancreáticos de rata. Estos investigadores observan que la cloroquina no influye en el pegado del ligando al receptor.

Por otro lado, existen reportes que catalogan a la primaquina y a la cloroquina, como inhibidores directos de algunos componentes del sistema de transducción de señales. Hui *et al* (53), realizaron ensayos *in vitro*, en los que vieron el efecto de varios compuestos antimaláricos, como la cloroquina y la primaquina, sobre la (PKC) y la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA). Ellos observaron que la primaquina y la cloroquina son inhibidores directos de estas cinasas. Sin embargo, cuando hablo de cinasas A y C, en realidad me refiero a una familia amplia de proteínas. Para el caso de las cinasas C, estas se pueden clasificar de acuerdo a la sensibilidad al calcio y fosfolípidos. Estos investigadores (53) toman todas las isoformas de las cinasas A y C presentes en los tejidos que estudian. La  $IC_{50}$  de la primaquina sobre la PKA es de  $284 \mu\text{M}$  e inhibe a la PKC en un  $19 \%$ ; la cloroquina inhibe a la PKC en un  $40\%$  y la  $IC_{50}$  para la PKA es de  $80 \mu\text{M}$ .

Ogwan'g *et al.* (54), en su estudio del papel de la cloroquina en la inhibición de la diferenciación de gametocitos de *Plasmodium falciparum*, reportan que la cloroquina ( $500 \mu\text{M}$ ) es un inhibidor de la fosfolipasa C y la fosfolipasa  $A_2$ , sin embargo, estos investigadores no hacen un análisis bioquímico, sino que lo deducen a partir de exflagelación de los gametocitos del *Plasmodium falciparum*. En ese mismo año, Zidovestzki *et al* (55) reportan que la  $IC_{50}$  para la cloroquina sobre la fosfolipasa  $A_2$  es de  $1.3 \text{ mM}$ . La primaquina también ha sido reportada como un inhibidor de la fosfolipasa  $A_2$  (56).

Por el lado de los receptores adrenérgicos hay trabajos que citan el efecto de la cloroquina sobre



aquellos, pero no el de la primaquina:

Chinyanga *et al.* ( 57) observaron que la cloroquina incrementa la fuerza contráctil de corazón de sapo. Sofola ( 59) administra cloroquina por vía intravenosa a perros anestesiados y observa que la administración de propranolol, el antagonista  $\beta$  adrenérgico, potencia los efectos de la cloroquina en la velocidad cardiaca, mientras que la adrenalina se opone a tal efecto.

Lot (59,60) observa una disminución en el efecto de la noradrenalina en músculo expansor secundario de pollo tratado con cloroquina. Este mismo investigador demuestra que la cloroquina provoca una hipersensibilidad a la noradrenalina y lo atribuye a que la cloroquina  $10 \mu\text{M}$  inhibe parcialmente la captura del  $\alpha$ -metil noradrenalina y a una concentración de  $100\mu\text{M}$  inhibe totalmente la captación del  $\alpha$ -metil noradrenalina. Cabe señalar que el  $\alpha$ -metil-noradrenalina es un intermediario del metabolismo de las catecolaminas, el cual es recapturado por la célula, para evitar que la siga estimulando.

Nosal *et al.*(61), comprueban que la cloroquina ejerce sus efectos en plaquetas disminuyendo, la actividad de la fosfolipasa  $A_2$ , pero no descartan la posibilidad de que pueda tener otros efectos a distintos niveles de la vía de transducción de señales. Williams & Davies (1984), observan que la cloroquina, disminuye la respuesta de linfocitos a los receptores adrenérgicos (62)

La cloroquina también se ha reportado como un compuesto que compite por los sitios inespecíficos de unión del [ $^3\text{H}$ ] dihydroalprenolol, molécula considerada como un antagonista  $\beta$  adrenérgico. En preparaciones de membranas se demostró que el alprenolol, un antagonista  $\beta$  adrenérgico es  $2 \times 10^6$  veces más potente que la cloroquina en bloquear los sitios  $\beta$  adrenérgicos.( 63). Este trabajo es el antecedente de otros, que consideran a la cloroquina como una molécula que elimina la captación inespecífica de los ligandos, como el de Limas & Limas (64) y Chugani *et al* (65).

Por otro lado, se ha observado que la cloroquina y la primaquina son inhibidores del nado reverso dependiente de calcio de *Paramecium calkinsi*, así como de corrientes de calcio en el mismo organismo. (66). Este punto es importante debido a que en el sistema de transducción de señales estan involucrados canales de calcio.

Debido estos antecedentes el presente trabajo tiene como

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la primaquina y la cloroquina en el sistema de transducción de señales  $\alpha_{1B}$  adrenérgico de hepatocitos de rata.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

**Material biológico.** - Se utilizaron ratas Wistar machos de 180-300 gramos.

**Químicos.** - (-) norepinefrina, (-) propranolol, difosfato de cloroquina, difosfato de primaquina, arginina-vasopresina, angiotensina II, sacarosa, 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (PMA), glucosa-6 fosfato, ácido piruvico, ácido láctico, fueron obtenidos de Sigma. Fentolamina fue de Bayer, [<sup>32</sup>P]-Pi y 3H prazosina (14.4 Ci/mmol), [<sup>14</sup>C]-Glucosa-1 fosfato (313 mCi/mmol), Inositol-1,4,5- trisphosphate <sup>3</sup>[H] radioreceptor assay Kit fueron de New England Nuclear. Silica gel H fue deMerck, la colagenasa fue obtenida de Worthington. Estos y todos los demas químicos fueron de la más alta calidad.

**1.- Obtención de hepatocitos:** Se utilizarón ratas Wistar macho de 150 a 300 gramos. Los hepatocitos se aislaron por el método de digestión con colagenasa, reportada por Berry y Friend (1969). Este consiste en canular el hígado por la vena porta y perfundir con un medio de Krebs-Ringer sin calcio a 37°C, bajo una atmósfera de carbógeno (95% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>) a pH 7.4. La digestión de la colágena, se inicia con la perfusión del hígado con medio Krebs-Ringer con calcio 1.2 mM, y colagenasa.

**2.- Cuantificación de la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ .** Se incubaron las células (10 mg de hepatocitos) por un lapso de 20 minutos bajo una atmósfera de carbógeno, en un medio estabilizador (KRB con calcio, piruvato 1.25 mM y lactato 12.5 mM). Después de ello, se estimularon las células por un minuto, con los diferentes agentes. La evaluación de la actividad de la glucógeno-fosforilasa  $\alpha$  se hizo siguiendo el ensayo descrito por Stalmans y Hers (1975), el cual se basa en la activación de la enzima por acción hormonal. Con las condiciones descritas por estos autores, la enzima lleva a cabo la reacción inversa a como lo hace naturalmente, es decir incorporando glucosa-1-fosfato al glucógeno. Para el ensayo se utilizó glucosa-1-fosfato marcada con <sup>14</sup>C determinandose la actividad de la enzima por la incorporación de la [<sup>14</sup>C]-glucosa al glucógeno. Dicha incorporación fue detectada por un contador de centelleo líquido. Los resultados se definieron como porcentaje de la actividad basal o porcentaje de la estimulación observada. La actividad de la fosforilasa  $\alpha$  es expresada en unidades. Una unidad esta definida en (nmoles

de producto/mg de células/min).

3.- **Obtención de membranas de hígado de rata.**- La obtención de membranas de hígado de rata se realizó siguiendo el protocolo de Neville (1967). Para ello, se sacrificaron cinco ratas, de las cuales se extrajo el hígado. Una vez hecho lo anterior, se fragmentó a los hígados y se homogenizaron a 4°C con 25 ml de HCO<sub>3</sub> 1mM por cada 10 gramos de tejido; el homogeneizado se centrifugó a 8,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en una solución de sacarosa al 69 % (v/v), se homogeneizó y se ajustó a 44 % de sacarosa con un refractómetro. El homogeneizado fue distribuido en tubos de centrifuga de 30 ml, se adicionó a cada tubo 10 ml de sacarosa al 42.3 %, para formar un gradiente de densidad. Estos gradientes se centrifugaron a 25,000 rpm durante 150 minutos a 4°C. Al final de la centrifugación, se extrajo la fracción membranal. Las membranas se resuspendieron en una solución amortiguadora fría de Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7.5, se homogenizó y lavó dos veces por centrifugación a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C cada vez. Finalmente, a la fase que precipitó, se homogenizó y resuspendió en la misma solución amortiguadora. Las membranas se guardaron en alícuotas en nitrógeno líquido. Se cuantificó la cantidad de proteína membranal por el método de Lowry *et al* (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estandar.

4.- **Saturación.**- Para el análisis de saturación con el ligando radioactivo, se utilizaron concentraciones crecientes de [<sup>3</sup>H] prazosina ( 0.5 nM a 15 nM). Se usaron 50 µg de proteína membranal. La diferencia entre la cantidad de [<sup>3</sup>H] Prazosina unida, en presencia y ausencia de fentolamina 10 µM (antagonista α<sub>1</sub> adrenérgico), es la cantidad de ligando unido específicamente.

5.- **Competencia.**- Los estudios de competencia, se hicieron utilizando membranas descongeladas y homogenizadas antes de cada experimento. Se utilizaron 50 µg de proteína membranal. Las membranas se incubaron con el ligando radioactivo [<sup>3</sup>H] Prazosina, en ausencia o presencia de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-3</sup> de cloroquina, primaquina o fentolamina. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 0.25 ml de medio Tris 50 mM-MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7.5 a 25°C, durante 60 minutos. La incubación se detuvo con medio Tris-MgCl<sub>2</sub> 10 mM frío, por filtración al vacío, en filtros de fibra de vidrio GF-C (Whatman), previamente saturadas con solución 50 mM Tris-Cl<sub>2</sub> 10 mM. Los filtros se lavaron tres veces con solución 50 mM

Tris-Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM. Los filtros secos se colocaron en viales con 4 ml de líquido de centelleo y se determinó la radioactividad en el contador de centelleo líquido.

6.- **Recambio de fosfoinosítidos.** Se incubaron de 50 a 60 mg de hepatocitos de rata, en el amortiguador Krebs Ringer bicarbonato, y [<sup>32</sup>P]Pi a una concentración de 10 µCi/ml por un espacio de 60 minutos a 37°C, en presencia de los distintos agentes, y según los requerimientos de cada experimento. Una vez concluido en tiempo, se centrifugaron los hepatocitos y se les añadió 6 ml de una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v). Se centrifugó de 3,000 rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se colocó en un tubo que contenía 4 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 6.0. Se agitó perfectamente en el vortex y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 minutos. Se obtuvieron dos fases, la fase superior (fase acuosa) se desecha. La fase del cloroformo se secó en la evaporadora Saavant. Una vez evaporado el cloroformo, los fosfolípidos se disolvieron y resuspendieron en 100 µl de una mezcla cloroformo:metanol (2:1,v/v). Los fosfolípidos se separaron en cromatografía de placa fina, en una sola dimensión, para ello, se tomaron 25 µl de fosfolípidos y se aplicaron en placas de silica gel H/acetato de magnesio (40:1), utilizando como sistema de solventes cloroformo/metano/agua/28% NH<sub>4</sub>OH (130:76:5:5). Con este procedimiento, se separaron la fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina y triglicéridos. Los lípidos fueron visualizados usando vapor de yodo. Una vez conocida la distancia de corrimiento del fosfatidilinositol se separó mecánicamente raspando la silicagel que lo contenía, para posteriormente determinar la cantidad de radioactividad incorporada bajo las distintas condiciones. (70).

7.-**Inositol (1,4,5) trisfosfato.** La cuantificación del inositol (1,4,5) trisfosfato se realizó utilizando el "Inositol-1,4,5-trisphosphate [<sup>3</sup>H] radioreceptor assay kit". Este tiene como base la competencia por los sitios de unión del receptor para el inositol 1,4,5 trisfosfato (IP<sub>3</sub>), entre el inositol 1,4,5 trisfosfato generado por la célula, y el [<sup>3</sup>H]-inositol 1,4,5 trisfosfato. Para determinar la cantidad de Inositol 1,4,5 trisfosfato generado por la célula, se interpola en una curva patrón, realizada con concentraciones conocidas del inositol trisfosfato y una concentración constante de membranas que contienen el receptor para IP<sub>3</sub>.

**8.-Determinación de los ensayos de competencia y saturación.** Los resultados de estos ensayos fueron analizados por los programas EBDA y LIGAND.

Generalmente cuando se hace una curva de saturación con un marcador radioactivo, observamos que existe una concentración de unión inespecífico; para poder determinar éste lo que se hace es saturar hasta un 99% con un ligando no radioactivo los sitios específicos y colocar una concentración máxima de ligando radioactivo. La unión específica puede ser estimada con una buena aproximación por medio de la diferencia entre la unión específica más alta y la unión específica más baja (74)

La constante de disociación y el número de sitios de unión del ligando se pueden obtener al linealizar el pegado específico, a través de una gráfica de Rosenthal (Scatchard). Este consiste en graficar la relación de las concentraciones de ligando unido/ligando libre vs ligando unido. El inverso de la pendiente de esta linealización nos da la constante de disociación (Kd) y la extrapolación de la línea hacia el eje de las abscisas nos da una estimación del número de sitios de unión del ligando. (74)

Por otro lado, la competencia de unión de un ligando trazador ( $[^3\text{H}]$ - prazosina) por otro ligando no marcado produce información cuantitativa acerca de la cinética y unión en equilibrio del ligando no marcado. (47).

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

La vasopresina, la angiotensina II, así como los agonistas  $\alpha_1$  adrenérgicos, ejercen sus efectos en el hígado al incrementar la concentración de calcio intracelular. Los cambios en la concentración de calcio interno generados por estos agentes, pueden ser monitoreados por fluorescencia. Sin embargo existen algunos agentes como la cloroquina y la primaquina que impiden ver el incremento de calcio interno por este método, ya que fluorescen o enmascaran la señal.

Una medida indirecta para determinar cambios en la concentración de calcio intracelular, es a través de la activación de proteínas dependientes de calcio. Una de estas proteínas es la fosforilasa *b* cinasa, que fosforila a la fosforilasa *b* convirtiéndola a su forma activa ( fosforilasa *a*). La fosforilasa *b* cinasa también puede ser activada por AMP cíclico, a través de los receptores acoplados a la activación de la adenilato ciclasa (por ejemplo el receptor  $\beta_2$  adrenérgico) (21). A pesar de que las catecolaminas que interaccionan con los hepatocitos de rata pueden ser reconocidos por los receptores  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  adrenérgicos, el efecto glucogenolítico de las catecolaminas, en ratas macho adultas se lleva a cabo por medio de los receptores  $\alpha_{1B}$  adrenérgicos (71). Por el contrario, en ratas fetales, hembras o con deficiencias en tiroideas o glucocorticoides, así como en la regeneración hepática, la glucogenólisis es mediada por el receptor  $\beta_2$  adrenérgico. A pesar de ello y para evitar cualquier efecto  $\beta_2$  adrenérgico, se optó utilizar para los ensayos fisiológicos dl-propranolol, el antagonista  $\beta$  adrenérgico. (72). Los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, representan un 83% del total de receptores  $\alpha$  adrenérgicos, por lo que la densidad de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos es muy pobre (73).

En la figura 1 podemos observar la activación de la fosforilasa *a* a través de la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica. En esta figura se aprecia el efecto dosis-dependiente de la actividad de fosforilasa *a* por el agonista natural, norepinefrina, en hepatocitos de rata. A concentraciones bajas de norepinefrina (entre 10 nM y 100 nM) hay un incremento pronunciado en la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, medida a través de la activación de la fosforilasa *a*, llegando a su efecto máximo ( $E_{max}$ ) a una concentración de 10  $\mu$ M de norepinefrina. Por ello, en el presente trabajo se utilizó esa concentración para los estudios fisiológicos.

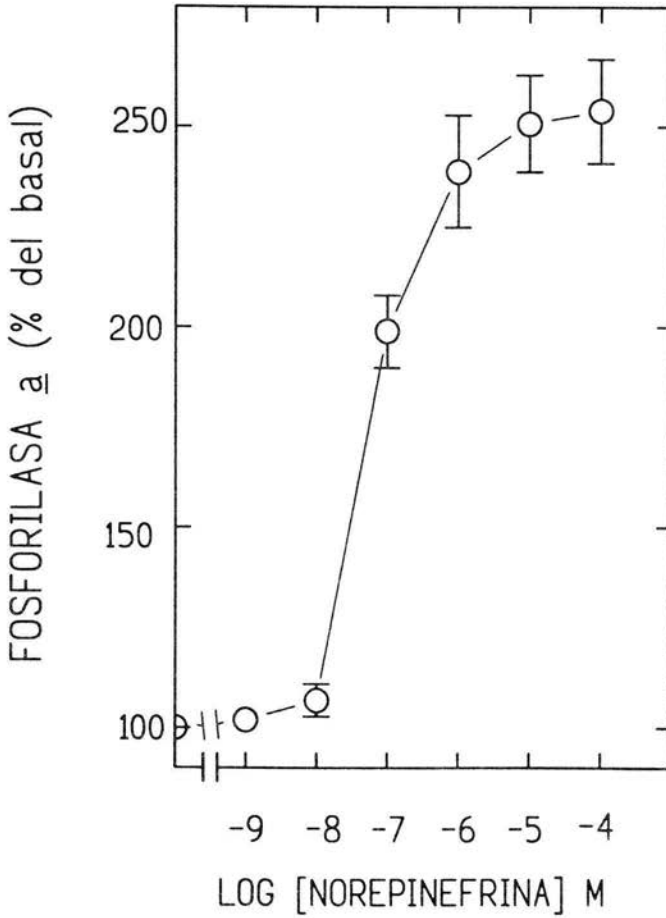


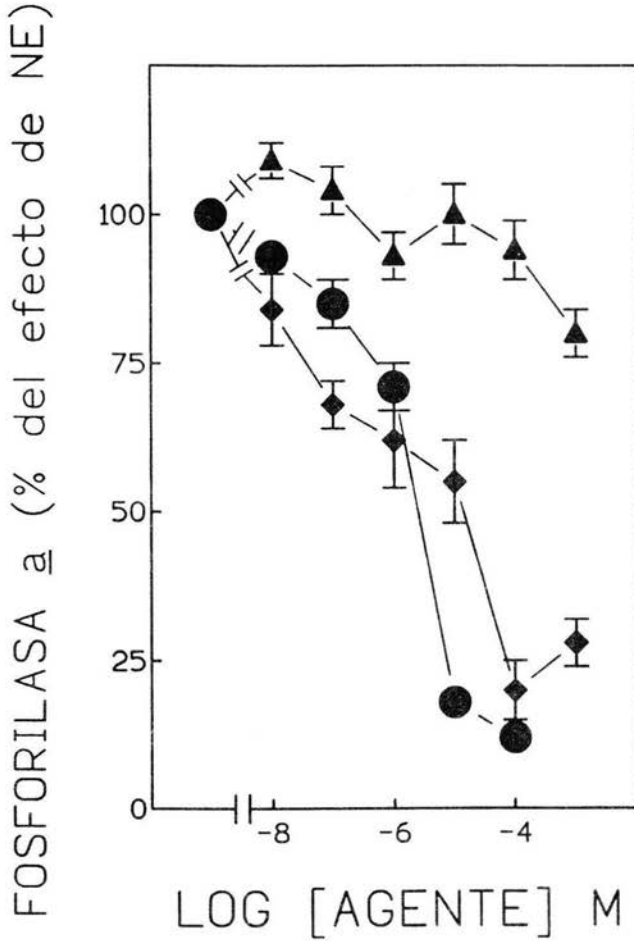
Figura 1. Efecto de la concentración de norepinefrina sobre la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ , en hepatocitos de rata. Los hepatocitos fueron incubados en presencia de dl-propranolol 10 $\mu$ M y concentraciones crecientes de norepinefrina. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estandar de 3 experimentos independientes y por triplicado. Los datos estan expresados en porciento de efecto respecto al nivel basal. El nivel basal en ausencia de norepinefrina y propranolol fue de 72 $\pm$ 4.07 unidades.



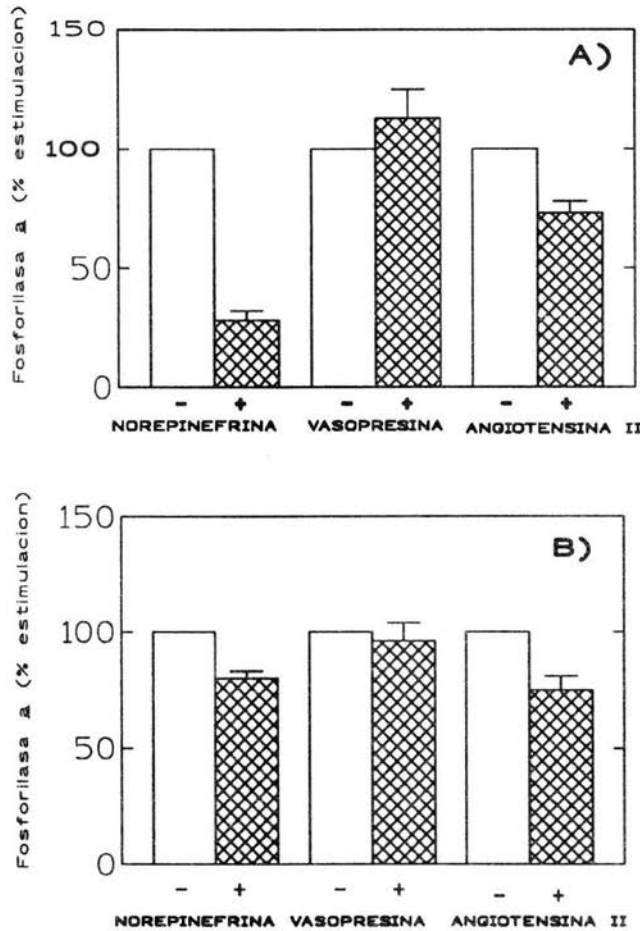
Generalmente se acepta que la actividad intrínseca de un compuesto se refiere a la cantidad de respuesta biológica realizada con el uso de la concentración máxima efectiva del compuesto (5). Como se aprecia en la figura 2, la cloroquina y la fentolamina bloquean en forma dosis-dependiente la estimulación  $\alpha_1$  adrenérgica, medida a través de la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ ; sin embargo la primaquina solo bloquea ligeramente esta señal. Esto que la cloroquina, pero no la primaquina, sea citotóxica, y que el efecto dosis-dependiente observado sea producto de la muerte celular, o bien que la cloroquina tenga un efecto sobre la acción  $\alpha_{1B}$  adrenérgica similar al de la fentolamina, es decir que se comporte como un antagonista  $\alpha_1$  adrenérgico, ya que se ha reportado que la cloroquina es un antagonista  $\beta$  adrenérgico (63). Para poder determinar cual de las dos hipótesis es correcta, lo primero que se hizo fue determinar la actividad de la fosforilasa  $\alpha$  estimulada por otros agentes no adrenérgicos, los cuales son reconocidos por receptores acoplados al recambio de fosfoinosítidos-calcio, estos receptores son el  $AT_1$  ( que reconoce a la angiotensina II), y  $V_{1A}$  (que reconoce a la vasopresina).

En la figura 3a y 3b, podemos ver el efecto de la cloroquina y la primaquina en la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ , mediada por la acción  $\alpha_1$  adrenérgica,  $AT_1$  y  $V_{1A}$ . En la figura 3a observamos que las células responden a angiotensina II ( $10^{-7}$  molar) y a vasopresina ( $10^{-8}$  molar) en ausencia y/o presencia de  $100 \mu M$  de cloroquina; en esa misma figura observamos que la respuesta a norepinefrina se ve disminuida notablemente. Esto demuestra que la cloroquina no es citotóxica, debido a que hubo respuesta estimulando al receptor  $AT_1$  y al  $V_{1A}$ , en presencia del agente antimalárico. En esta misma figura vemos que el efecto de la cloroquina es más pronunciado sobre la respuesta a noradrenalina, y no lo es tanto sobre la respuesta a vasopresina (receptor  $V_{1A}$ ) y a angiotensina II (receptor  $AT_1$ ) aunque la respuesta a angiotensina II en presencia de la cloroquina disminuyen un 24 % respecto al control. Estos resultados sugieren que la cloroquina parece ser citotóxica y, que su efecto es específico de la vía  $\alpha_1$  adrenérgica y no para otras vías acoplados al mismo sistema de transducción (el de recambio de fosfoinosítidos).

Los efectos de la cloroquina obtenidos en el presente trabajo son distintos a los obtenidos por Lot y Bennett en 1982. Estos investigadores observan una disminución en la contracción del músculo expansor secundario de pollo en presencia de cloroquina, pero solo a concentraciones grandes como  $100 \mu M$ . Esta diferencia se puede deber a las condiciones experimentales utilizadas por dichos investigadores,



**Figura 2. Efecto de distintos agentes en la actividad de la fosforilasa  $\alpha$  en el sistema  $\alpha_1$  adrenérgico de hepatocitos de rata.** Los hepatocitos fueron incubados en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de dl-propranolol y  $10 \mu\text{M}$  de norepinefrina más concentraciones crecientes de cada uno de los agentes (●) difosfato de cloroquina; (▲) difosfato de primaquina; fentolamina (◆). Los datos representan el promedio  $\pm$  error estandar de 4-12 experimentos independientes y por triplicado. Los datos están expresados en porcentaje de efecto de norepinefrina.



**Figura 3.** Efecto de distintos agentes en la actividad de la fosforilasa  $\alpha$  en los sistema  $\alpha_1$  adrenérgico,  $V_{1A}$  y  $AT_1$  de hepatocitos de rata. (A) Los hepatocitos fueron incubados en presencia de 10  $\mu$ M de dl-propranolol y 10  $\mu$ M de norepinefrina o vasopresina 0.1 nM o angiotensina II 10 pM en presencia (+) o en ausencia (-) de cloroquina 1 mM. (B). Igual que en (A), pero sustituyendo la cloroquina por primaquina 1mM. Los datos representan el promedio  $\pm$  error estandar de 4-5 experimentos independientes y por triplicado. Los datos estan expresados en porciento de estimulación de las hormonas en ausencia de los agentes antimaláricos

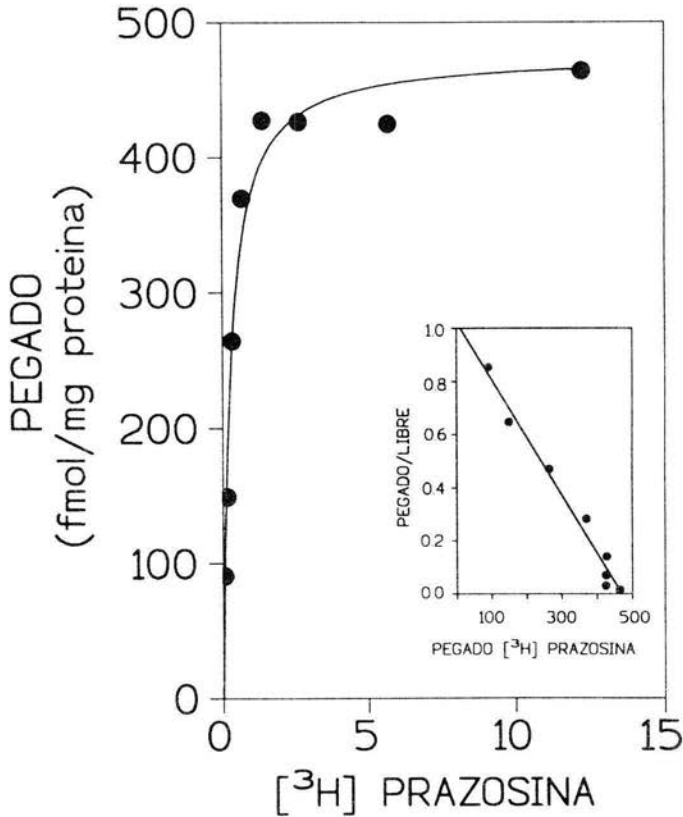
además de que el sistema empleado es distinto y la regulación fisiológica en los tejidos también. Es interesante ver que dos agentes estructuralmente muy parecidos modifican la fisiología de una forma distinta (al menos la acción  $\alpha_1$  adrenérgica)

Por otro lado, en la figura 3b apreciamos que la primaquina no ejerce un efecto notable sobre la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ , estimulada por noradrenalina, angiotensina II o vasopresina, en hepatocitos. Esta figura nos muestra que a pesar de la gran similitud estructural de la primaquina y la cloroquina, estas tienen efectos distintos sobre el sistema  $\alpha_1$  adrenérgico.

De las figuras 2 y 3a podemos formular la hipótesis de que la cloroquina sea un antagonista  $\alpha_{1B}$  adrenérgico. Esto, debido a que la cloroquina muestra un efecto semejante a la del antagonista  $\alpha$  adrenérgico fentolamina y ese bloqueo es receptor específico, es decir que sólo bloquea la activación de la fosforilasa  $\alpha$  mediada por los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos y no la mediada por los receptores  $AT_1$  y  $V_{1A}$ , los cuales se encuentran acoplados al mismo sistema de transducción.

Para poder responder a la interrogante planteada en el párrafo anterior, lo primero que se hizo fue determinar el número de receptores  $\alpha_{1B}$  adrenérgicos presentes en membranas de hígado de rata. Para ello se usaron concentraciones crecientes de [ $^3$ H]-prazosina, un antagonista altamente afin por los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos ( $K_i$  de 0.1 a 1 nM). En la figura 4 podemos ver la unión específica (ver metodología) de la [ $^3$ H]-prazosina en membranas de hígado de rata. En esta figura se observa que la [ $^3$ H]-prazosina tiene una alta afinidad por el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico (32), además de que es saturable y específica. Estas características son indispensables para considerar que la unión de algún ligando es específica. Esta curva de saturación es monofásica lo que describe la existencia de una población homogénea de sitios de unión. Esto último se pudo corroborar utilizando el análisis de Scatchard (recuadro de la figura 4), el cual nos indica que la población de sitios de unión reconocidos por la [ $^3$ H]-prazosina presenta una afinidad homogénea para este ligando con una constante de afinidad ( $K_D$ ) para la prazosina de  $0.176 \pm 0.033$  nM. El número de sitios de unión ( $B_{max}$ ) fue de  $433 \pm 36$  fmol/mg de proteína de membranas de hígado de rata.

Para estudiar el efecto de la cloroquina, la primaquina y la fentolamina sobre la unión de la



**Figura 4.** Curva de saturación de [<sup>3</sup>H]-prazosina, utilizando membranas de hígado de rata. Las membranas (50  $\mu$ g de proteínas) fueron incubadas con concentraciones crecientes de [<sup>3</sup>H]- prazosina, a 25 °C durante 1 hora, en el amortiguador Tris 50 mM- MgCl 10 mM. La gráfica representa la unión específica de [<sup>3</sup>H]-prazosina a los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos el cual se determinó por la diferencia entre la cantidad total de [<sup>3</sup>H]-prazosina unida y la unión no específica, determinada por la presencia de 10  $\mu$ M de fentolamina (que ha saturado todos los sitios  $\alpha_1$  adrenérgicos). El análisis de Rosenthal de la misma curva se encuentra en el recuadro. La figura es representativa de 4 experimentos independientes usando diferentes preparaciones de membranas.

[<sup>3</sup>H]-prazosina al receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico, se hicieron ensayos de competencia de este ligando marcado, con cada uno de los agentes enunciados al principio. En la figura 5 podemos observar que la fentolamina, desplaza el pegado de la [<sup>3</sup>H]-prazosina en una forma dosis dependiente desde el orden nanomolar hasta el milimolar. Por el contrario, la cloroquina y la primaquina desplazan el pegado de la [<sup>3</sup>H]-prazosina en ordenes de magnitud mayores, los cuales van desde el orden micromolar hasta el milimolar. Esta figura nos indica que la cloroquina y la primaquina son antagonistas  $\alpha_{1B}$  adrenérgicos, pero con un grado de afinidad muy pequeño hacia el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenergico, es decir que se unen a estos receptores solo a concentraciones muy grandes del agente (Tabla I).

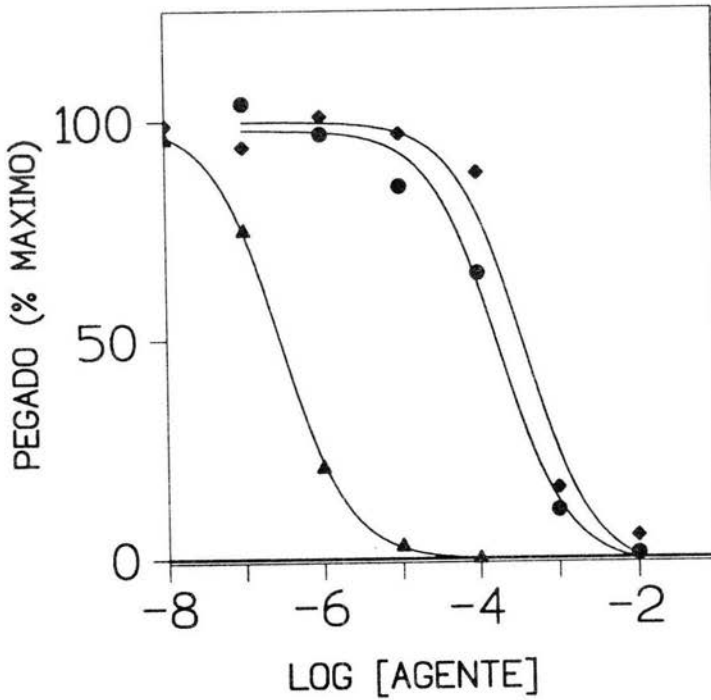
Tabla I (Constantes de inhibición de los agentes fentolamina, cloroquina y primaquina, los datos son la media  $\pm$  error estandar de 4 experimentos independientes, usando diferentes preparaciones de membranas.)

Tratamiento	Ki (nM)	Pendiente
Fentolamina	53.71 $\pm$ 7.9	1.02 $\pm$ 0.06
Cloroquina	35595 $\pm$ 3554	1.05 $\pm$ 0.02
Primaquina	74329 $\pm$ 7196	1.09 $\pm$ 0.3

Las curvas de competencia de la [<sup>3</sup>H]-prazosina con los agentes antes citados (fentolamina, cloroquina y primaquina), muestran una pendiente (coeficiente de Hill)  $\approx$  1, lo que indica la presencia de un solo sitio de unión para estos agentes.

Lot y Bennet (60), observan que el efecto fisiológico de la cloroquina sobre la acción  $\alpha$  adrenérgica en el músculo extensor secundario se revierte con solo lavar el tejido. Estos investigadores concluyen que la cloroquina no es un bloqueador de la señal  $\alpha$  adrenérgica. Este último punto puede deberse a que los receptores  $\alpha$  adrenérgicos forman una familia heterogénea de receptores y que los receptores  $\alpha_1$  presentes en el músculo expansor secundario no sean afines con la cloroquina, aun a concentraciones grandes.

Como podemos observar en la figura 2, la cloroquina y fentolamina, tienen un efecto sobre un



**Figura 5.** Desplazamiento del pegado específico de la  $[^3\text{H}]$ -prazosina por diversos agentes usando membranas de hígado de rata. Las membranas (50  $\mu\text{g}$  de proteína membranar) fueron incubadas con 0.23 pmoles de  $[^3\text{H}]$ - prazosina junto con concentraciones crecientes de cada agente: (▲) fentolamina, (●) difosfato de cloroquina y (◆) difosfato de primaquina. La reacción se hizo en condiciones en equilibrio (25  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora) en el amortiguador Tris 50 mM-  $\text{MgCl}_2$  10 mM. La gráfica representa el porcentaje de pegado específico máximo de la  $[^3\text{H}]$ -prazosina a los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. La figura es representativa de 4 experimentos independientes usando diferentes preparaciones de membranas.

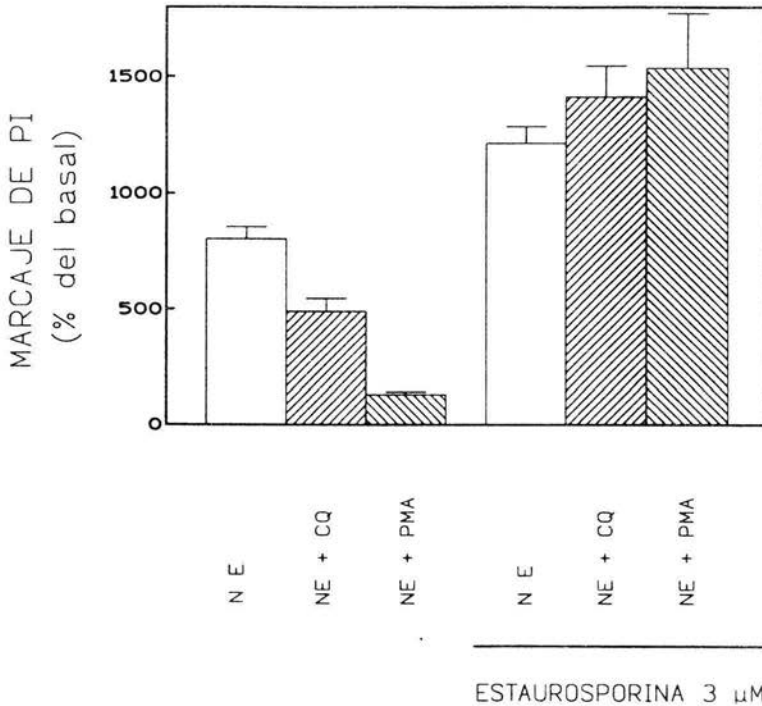
parámetro fisiológico muy parecido, y debido a que la fentolamina es un antagonista  $\alpha$  adrenergico, se esperaría que la cloroquina tuviera el mismo comportamiento en los ensayos de competencia. Dado que existen diferencias en el grado de afinidad de la fentolamina y la cloroquina hacia el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico y que estos datos no correlacionan con los datos fisiológicos (medido como la activación  $\alpha_1$  adrenérgica de la fosforilasa  $\alpha$ ), el efecto de la cloroquina sobre la acción  $\alpha_1$  adrenergica, puede ocurrir además a otro nivel. Esto quiere decir que la cloroquina actúa como antagonista débil pero además actúa a otro nivel, el cual bloquea la respuesta desde el orden nanomolar. Este aspecto es interesante, ya que la cloroquina generalmente se utiliza para inhibir el reciclaje de los receptores. La posible participación de la cloroquina en un sistema de transducción de señales como es el  $\alpha_1$  adrenérgico se debe de considerar al realizar experimentos en los que se utilice la cloroquina como un inhibidor del reciclaje de los receptores.

La figura 3a nos muestra que a pesar de que los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos,  $AT_1$  y  $V_{1A}$ , están acoplados al mismo sistema de transducción (recambio de fosfoinosítidos-calcio), tienen distinta sensibilidad a la cloroquina. Esta figura recuerda a las observaciones hechas en el laboratorio de García-Sáinz, en las que el PMA no bloquea el efecto de vasopresina y angiotensina II en el recambio de fosfoinosítidos en hepatocitos de rata, pero sí bloquea la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica (47). Estas semejanzas, sugieren que la cloroquina pueden estar modulando a los sistemas  $\alpha_1$ ,  $AT_1$  y  $V_{1A}$ , en una forma similar a como lo hace el PMA.

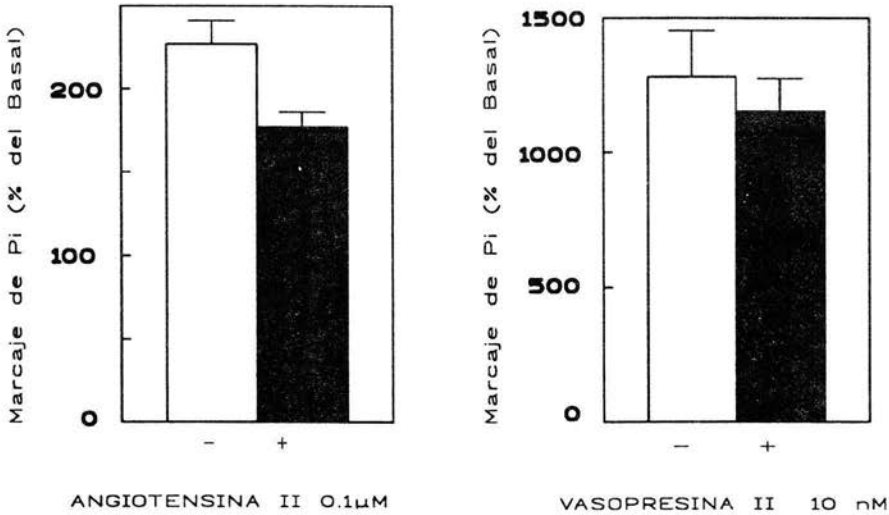
En la figura 6 podemos apreciar el efecto de la cloroquina y del PMA sobre la acción  $\alpha_1$  adrenergica en hepatocitos de rata, medido como recambio de fosfoinosítidos. En esta figura vemos que la cloroquina bloquea la respuesta a norepinefrina en un 40 %, mientras que el PMA la tira en un 84 %. En esa misma figura, se aprecia que la estaurosporina, un inhibidor de la PKC, revierte el efecto de la cloroquina y el del PMA. Como podemos apreciar la cloroquina es mucho menos eficaz que el PMA para bloquear el efecto  $\alpha_1$  adrenérgico ya que se requieren concentraciones mayores del agente, y aún así el efecto es menor (Fig 6). La figura 6 apoya aun más la hipótesis de que la cloroquina pudiese estar actuando a nivel de la proteína cinasa C. Es importante recordar que la activación de la proteína cinasa C está involucrada en el proceso de desensibilización de la señal  $\alpha_1$  adrenérgica, pero no de las señales de



cloroquina es que este agente antimalárico al igual que el PMA no disminuyen el efecto de la vasopresina ni de la angiotensina II en el recambio de fosfoinosítidos en hepatocitos de rata (Figura 7). Dado que ambos receptores ( $AT_1$  y  $V_{1A}$ ) están acoplados al mismo sistema que los  $\alpha_1$  adrenérgicos y que aquellos son insensibles a la activación de la PKC, un posible punto de divergencia puede ser la ausencia de las isoformas de PKC que desensibilizan al receptor o quizás la desensibilización pueda darse a un nivel distinto a la activación de la PKC.



**Figura 6. Efecto del PMA y la cloroquina en el recambio de fosfoinosítidos, estimulado por el sistema  $\alpha_1$  adrenérgico de hepatocitos de rata.** Los hepatocitos (50 mg) fueron incubados a 37 °C durante 1 hora en presencia de 10  $\mu$ Ci de [ $^{32}$ P]-Pi y los distintos agentes. Norepinefrina (NE) 10  $\mu$ M + propranolol 10  $\mu$ M, cloroquina 100  $\mu$ M, PMA 1  $\mu$ M. Los datos están expresados como el porcentaje del marcaje basal de fosfoinosítidos. La gráfica representa el promedio  $\pm$  el error estándar de 7 experimentos independientes. El basal en ausencia de norepinefrina y propranolol es de 1292 $\pm$ 215 cpm/ 40 mg de células.

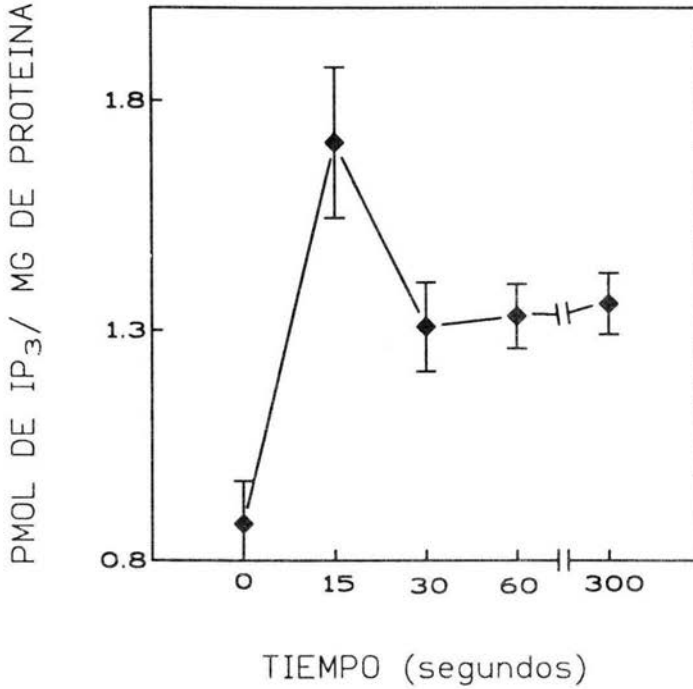


**Figura 7. Efecto del PMA y la cloroquina en el recambio de fosfoinosítidos, estimulado por los sistemas de los receptores  $AT_1$  y  $V_{1A}$  presentes en hepatocitos de rata.** Los hepatocitos (50 mg) fueron incubados a 37 °C en presencia de 10  $\mu$ Ci de [ $^{32}$ P]-Pi y los agentes. (A) estimulación en el marcaje de fosfoinosítidos por angiotensina II (100nM) en presencia (+) o ausencia (-) de cloroquina 100 $\mu$ M, (B) estimulación en el marcaje de fosfoinosítidos por vasopresina en presencia (+) o ausencia (-) de cloroquina 100 $\mu$ M, Las graficas representan el promedio  $\pm$ error estándar de 4 a 5 experimentos independientes.

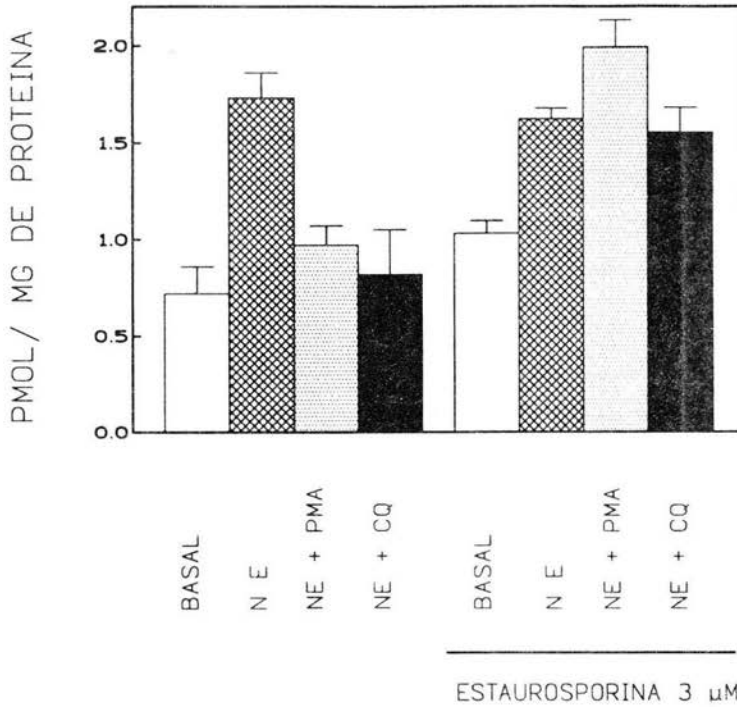
La información contenida en las figura 6, es opuesta a la reportada por Hui *et al* (53), los cuales observan que lo cloroquina y la primaquina provocan una caída en la actividad enzimática de un extracto total de proteínas cinasas C dependientes de fosfolípidos de cerebro de rata. Este punto de contraste puede deberse a que el nivel de expresión de las diferentes isoformas presentes en cerebro e hígado de rata es distinto (75,76).

Debido a que la cloroquina ha sido reportada con un inhibidor de la PLC, un punto que se tomó en cuenta, es el de considerar la posible modulación de la PLC por la cloroquina en hepatocitos de rata, así como sobre la acción  $\alpha_1$  adrenérgica medida como producción de  $IP_3$ . Primero se realizó un curso temporal en la producción de D-myo-inositol (1,4,5) trisfosfato. Como podemos observar en la figura 8, la producción de máxima de D-myo-inositol (1,4,5) trisfosfato después de la estimulación con la noradrenalina fue a los 15 segundos. Una vez establecido el tiempo en el cual hay un nivel máximo de D-myo-inositol (1,4,5) trisfosfato después del estímulo con la hormona, realicé los experimentos para determinar el efecto de la cloroquina sobre la  $PLC\beta_1$ , así como sobre la vía  $\alpha_1$  adrenérgica. En la figura 9, está representado el efecto de norepinefrina, norepinefrina más PMA  $10^{-6}$  molar y norepinefrina más cloroquina  $10^{-4}$  molar. Se puede apreciar que la cloroquina al igual que el PMA inhiben la respuesta a noradrenalina y este efecto se revierte en presencia de estaurosporina  $3\mu M$ . Estos datos son consistentes con los obtenidos en el recambio de fosfoinosítidos. El control negativo con cloroquina muestra que la actividad basal en presencia de estaurosporina de la PLC y en presencia de estaurosporina y cloroquina, no hay un cambio significativo en la producción de D-myoinositol (1,4,5) trisfosfato.

Generalmente cuando se utiliza algún inhibidor de la proteína cinasa C se revierten los efectos fisiológicos que está pudiera causar. Debido a que los experimentos realizados en presencia de estaurosporina se revierte el efecto causado por cloroquina, podemos decir que este agente antimalárico podría estar estimulando a la proteína cinasa C. Esta sugerencia se apoya en varias similitudes farmacológicas con el PMA: primero los efectos fisiológico causados por la cloroquina son muy similares a los causados por el PMA; segundo, que ambos agentes son capaces de bloquear la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, pero no la respuesta a vasopresina y angiotensina II y tercero, que los efectos de ambos agente son revertidos por estaurosporina



**Figura 8. Curso temporal en la producción de D-myo-inositol 1,4,5 trisfosfato por la estimulación  $\alpha_1$  adrenérgica.** Los hepatocitos (50 mg) fueron incubados a 37 °C en presencia de 10  $\mu$ M de dl-propranolol y 10  $\mu$ M de norepinefrina, la reacción se paró con ácido perclórico al 30 % en los tiempos señalados en la gráfica. La gráfica representa el promedio  $\pm$  error estandar de 3 experimentos independientes. Para calcular la catidad de IP<sub>3</sub> generado se realizó una curva patrón con cantidades conocidas de IP<sub>3</sub>.



**Figura 9.** Efecto de la cloroquina (100 $\mu$ M) y el PMA (1 $\mu$ M) en la producción de D-myoinositol 1,4,5 trisfosfato en la vía  $\alpha_1$  adrenérgica (10  $\mu$ M de norepinefrina + 10  $\mu$ M de propranolol) de hepatocitos de rata. Las células fueron incubadas por 15 segundos con los agentes según el experimento. Para el caso de la estaurosporina, los hepatocitos fueron preincubados con este inhibidor 20 minutos antes de colocar los otros agentes. La gráfica representa el promedio  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.

## VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que:

- a) La cloroquina inhibe la respuesta  $\alpha_{1B}$  adrenérgica de hepatocitos de rata en una forma dosis-dependiente.
- b) La cloroquina presenta por lo menos dos sitios de acción sobre la vía  $\alpha_{1B}$  adrenérgica en hepatocitos de rata, el primero es la interacción de la cloroquina con el receptor (a concentraciones muy grandes del agente), bloqueando en parte la vía; el segundo es la interacción de la cloroquina con un mecanismo sensible a estaurosporina.
- c) La cloroquina bloquea la vía  $\alpha_1$  adrenérgica, pero no la de  $AT_1$  y  $V_{1A}$  en hepatocitos de rata.
- d) La primaquina interacciona con el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico a concentraciones muy grandes, pero no se observa un efecto pronunciado sobre la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica.
- e) La primaquina no modifica notablemente la respuesta  $AT_1$  y  $V_{1A}$  de hepatocitos de rata.

## VII. PERSPECTIVAS

Dado que la cloroquina disminuye la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, a través de un mecanismo sensible que estaurosporina, podemos presumir la activación de alguna isoforma de la PKC ( que module la respuesta  $\alpha_1$  pero no la de vasopresina y angiotensina II presente en hepatocitos de rata. Esta cinasa puede estar modulando la actividad de varias proteínas que posiblemente regulen la respuesta  $\alpha_{1B}$  adrenérgica presentes en estas células.

En caso de que la cloroquina estimule la actividad de alguna isoforma de la PKC, esto puede ser importante para poder identificar a las distintas isoformas de PKC por medio a su sensibilidad a cloroquina.

La activación de las cinasas C, lleva consigo la regulación de algunas vías metabólicas, expresión de algunos oncogenes (directa o indirectamente), división celular, regulación de otros sistemas de transducción, etc. Como podemos observar, la simple activación de alguna(s) isoforma(s) de la PKC pueden generar respuestas multiples, que son importantes desde el punto de vista metabólico y fisiológicos. Por ello es importante averiguar si hay activación de alguna isoforma de PKC, por la cloroquina, ya que el uso de este agente como producto terapéutico esta en vigencia.

Por otro lado, otro posible sitio de acción de la cloroquina sobre el sistema  $\alpha_{1B}$  adrenérgico de hepatocitos de rata, es la inhibición de la actividad de algunas fosfatasas. Debido a que no se conoce el mecanismo preciso de regulación de la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, puede ser que existan proteínas fosforiladas que regulen el sistema, y que en estado fosforilado sean inactivas de tal forma que necesiten desfosforilarse para poder activarse. Recordemos que en otros sistemas celulares, el receptor  $\alpha_{1B}$  adrenérgico puede ser fosforilado, de forma tal que no se descarta que en hepatocitos de rata suceda lo mismo; esta fosforilación lleva consigo la desensibilización del sistema. Si las fosfatasas se inactivan, puede ser que el receptor permenezca fosforilado (temporal o momentaneamente) y por lo tanto no se lleve a cabo la respuesta promovida por los agonistas naturales para ese receptor.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- García Sáinz, J.A. (1996). *Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular*. 2a ed. La ciencia desde México. *en prensa*.
- 2.- Darnell, J; Lodish, H; Baltimore, D. (1990). *Molecular Cell Biology*. 2a ed. Scientific American Books. N.Y. 1105 pp.
- 3.- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J. ; Raff, M.; Roberts,K.; Watson, J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*. 3era ed. Garland Publishing, In. USA & Inglaterra.
- 4.- Wilson,J.D & Foster, D.W (1985). *Williams Textbook of Endocrinology*. 7a ed. W.B.Saunders Company.
- 5.- Williams, L.T y Lefkowitz, R (1978). *Receptor binding studies in adrenergic pharmacology*. Raven Press. New York. 157 pp..
- 6.- *Trends in Pharmacological Sciences Receptor and Channel Nomenclature Supplement* (1996). 7a edición. Elseviers Trends Journals. Inglaterra.
- 7.- Changeux, J.P (1993). *Chemical signaling in the brain*. Sci. Am. **269**: 30.37.
- 8.- Unwin, N. (1993). *Cell* **72**: 31-34.
- 9.- Su-J; Batzer-A; Sap-J. (1994). *J.Biol.Chem.* **269 (29)**:18731-18734.
- 10.- Hernández-Sotomayor, M.T (1995). *Ciencia* .**46**:533-541.
- 11.- Kobilka, B. (1992). *Ann. Rev. Neurosci.* **15**:87-111.
- 12.- Birbaumer, L. (1992). *Cell*. **71**: 1069-1072.
- 13.- Hepler, J.R; Gilman, A.G. (1992). *TIBS* **17**: 383-387.
- 14.- Sterweis & Smrcka (1992).*TIBS* **17**: 502-506.
- 15.- Neer , E.J (1995). *Cell* **80**: 249-257.
- 16.- Reuveny. E; Slesinger-P.D; Morales-J.M; Iñiguez-Lluhi-J.A; Lefkowitz-R.J; Boume-H.R; Jan- Y N; Jan. L.Y. (1994). *Nature*. **370(6485)**:143-146.
- 17.- Gilman, A. G (1987). *Annu. Rev. Biochem.* **56** : 61 5-649.
- 18.- Gill, D.M. (1986). *Bacterial Protein Toxins. FEMS symposium No. 24*. Editores Alouf, J,E; Fehrenbach, F,J; Freer, J,H; Jeljaszewicz, J. Academic Press.
- 19.- Taylor, S,J; Smith, J,A y Exton, J,H (1990). *J.Biol.Chem.* **265**:17150-17156. *in 12*.



- 20.- Taylor S.J, Buechler, J.A y Yonemoto, W (1990). *Annu. Rev. Biochem* **59**:971-1005.
- 21.- Blackmore, P.F; Exton, J.H. (1985). *In Methos in enzymology*. Vol 109
- 22.- Clapham. D.E (1995). *Cell* **80**:259-268
- 23.- Malarkey. K; Belham-CM; Paul-A; Graham-A; McLees-a; Scott-PH; Plevin-R (1995). *Biochem. J.* **309 (Pt 2)**: 361-375.
- 24.- Hennager, D, Welsh, M; DeLisle, S (1995). *J. Bioch.* **270 (10)**: 4959-4962.
- 25.- Nishizuka. Y (1984). *Science* **225**: 1365-1370.
- 26.- Berridge, M.J e Irvine, R.F (1989). *Nature*. **341**:197-205.
- 27.- Zhang.L; Bradley, M.E; Buxton.I.L.O (1995). *Int. J.Biochem.Cell* **27 (12)**:1231-1248.
- 28.- Nishizuka, Y (1984). *Science*. **225**: 1365-1370.
- 29.- Ford, A; William, T; Blue, D; Clarke, D. (1994). *TIBS*. **15**:167-170.
- 30.- Bylun, D.B (1992). *FASEB J* **6**:832-839..
- 31.- Graham, R.M; Pérez, D.M; Piascik, M.T; Riek, R.P; Hwa, J. (1995). "Characterisation of  $\alpha_1$  adrenergic receptor subtypes". en *Adrenoceptors. Structure, function and Pharmacology*. Editado por Ruffolo R.R Jr. Pp 15-22.
- 32.- García-Sainz, J; Romero-Avila, M; Alcántara-Hernández, R; Macías-Silva, M; Olivares- Reyes, A y Gonzales-Espinosa, C (1992). *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **186 (2)**. 760-767.
- 33.- García-Sainz, J; Romero-Avila, M.T (1993). *Mol.Pharmacol.* **44**:589-594...
- 34.- Michel, A.D; Loury D.N; Whiting R.L (1989). *Br. J. Pharmacol* **98**:883-889.
- 35.- Michel, M.C; Büschert, R; Kerker, J; Krancis, H, H; Erdbrugger, W; Brodde, O. (1993). *Naucyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **347**: 180-185.
- 36.- Lomasney, J.W; Cotecchia, S; Lefkowitz, R.J; Caron, M.G (1991). *Bioch. Bioph. Acta* **1095**:127-139.
- 37.- Minneman, K.P, Esbenshade, T.A. (1994). *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* **34**:117-133.
- 38.- Dianing, W; Huiping, J; Melvin, S (1995). *J.Biol.Chem.* **270(17)**: 9828-9832
- 39.- Lattion, A-L; Diviani, D; Cotecchia, S. (1994). *J.Biol Chem* **269(36)**: 22887-22893.
- 40.- Hwa, J; Graham, R.M; Perez, D.M. (1995). *J.Biol. Chem.* **270 (39)**:23189-23195\_
- 41.- Leeb-Lundberg,L.M.F; Cotecchia, S; Lomasney,J. W; DeBernardis, J.F; Lefkowitz. R.J; Caron, M.G (1985). *Proc. Natl. Acad.Sci.U.S.A.* **82**:5651-5655.

- 42.- Fredrik, L.L; Cotecchia, S; deBlasi, A; Caron, M.G; Lefkowitz, R.J. (1987). *J.Biol.Chem.* **262**:7 3098-3105.
- 43.- Bouvier, M; Fredrick, L.L; Benovic, J.L; Caron, M.G; Lefkowitz, R.J. (1987). *J.Biol.Chem.* **262**(7):3106-3113
- 44.- Vázquez-Prado, J & García-Sáinz, J.A. (1996). *Molecular Pharmacology.* **50**:17-22.
- 45.- Neil, S.R; Lefkowitz, R.J; Caron, M.G; Lattion, A.L; Diviani, D; Cotecchia, S. (1994). *J.Biol.Chem* **269**(36):22887-22893.
- 46.- Beeler, J & Cooper, R (1995). *Biochem. J.* **305**:73-79.
- 47.- Corvera, S; Schwartz, K.R; Graham, R.M; García-Sáinz, J.A (1986). *J. Biol.Chem.* **261**: 520- 526.
- 48.- Streinman, R.M; Mellman, I.S; Muller, W; Cohn, Z (1983). *J.Cell Biol.* **96** (1): 1-27.
- 49.- Schwart, A; Bolognesi, A; Fridovich, S.E (1984). *J.Cell. Biol.* **98**: 732-738.
- 50.- Mellman, I; Fuch, R y Helenius (1986). *Ann. Rev.Biochem.* **55**, 663-700.
- 51.- Rademaker, B; Kramer, K; Bast, A; Timmerman, H (1990). *Res-Commun-Chem-Pathol-Pharmacol.* **67**(3):321-336.
- 52.- Fyles, J.M; Cawthorne, M.A; Howell, S.L. (1987). *Biosci-Rep.* **7**(1):17-32.
- 53.- Hui, B; Ternail, B; Polya, G. (1994). *Biol.Che. Hoppe-Seyler.* **375**:527-535.
- 54.- Ogowan'g, R; Mwangi, J; Gachihi, G; Nwachukwu, A; Roberts, C; Martin, S. (1993). *Bioch. Pharm.* **46**(9): 1601-1606.
- 55.- Zidovetzki, R; Sherman, I; O'Briend, L. (1993). *J. Pharasitology* **79**(4):565-570.
- 56.- Stewart, A.G; Tomlinson, P. R; Wilson, J.W; Harris, T. (1995). *Am-J-Respir-Cell-Mol-Biol.* **12** (1):110-119.
- 57.- Chinyanga, H.D; Fletcher, J.J; Vartanian, G.A (1976). *West-Afr-J-Pharmacol-Drug-Res* **3**(2): 90-101.
- 58.- Sofola, O.A (1983). *Clin-Physiol.* **3**(1):75-82
- 59.- Lot, T.Y (1986) *Medical Biology.* **64**:207-213.
- 60.- Lot, T.Y y Bennett, T (1982). *Medical Biology* **60**:307-315.
- 61.- Nosal, R; Jancinova, V; Petrivoka, M. (1995). *Thrombosis Research* **77**:6.
- 62.- Williams, W.R; Davies, B.H. (1984). *J.Clin-Lab-Immunol.* **13**(1):29-34.
- 63.- Meier, K.E; Ruoho, A.E. (1984). *Biochim-Biophys-Acta.* **804**(3): 331-340.

- 64.- Limas, C.J; Limas, C. (1984). *Circ-Res* **55** (4): 524-531.
- 65.- Chugani, D.C; Ackermann, R.F; Phelps, M.E (1988). *J-Cereb-Blood-Flow-Metab.* 8(3):291- 303.
- 66.- Barry, S.R; Bernal, J. (1993). *J.Comp.Physiol.A* **172**:457-466.
- 68.- Neville, D.M Jr. (1968). *Biochem, Biophys. Acta.* 154:540-552.
- 69.- Lowry, O.H; Rosebrough, N.J; Farr, A.L; Randall, R.J. (1951). *J.Biol.Chem.* 193:265-275.
- 70.- García-Sáinz, J.A; Fain, J.N. (1980). *Molecular Pharmacology* **18** : 72-77.
- 71.- Studer, R.K & Borle, A.B (1983). *Biochem. Bioph. Acta.* **11149**: 302-314.
- 72.- Hoffman, B.B; Lefkowitz, R.J. (1990). In Gilman, A. G; Rall, T.W, Nies, A.S; Taylor, P (Eds). *Godman and Gilmans, The Pharmacological Basis of therapeutics.* 8th. Ed. Pergamon Press. pp 187-220.
- 73.- Goodhard, M y Hanoune, J. (1986). In *Hormonal control of gluconeogenesis Vol II Signl transmission.* Editor Raus-Friedmann. Ed. CRC Press
- 74.- Hulme, E.C y Birdsall, J.M (1992). Strategy and tactics in receptor-binding studies. In *Receptor-ligand interactions a practical aprroach.* Editor Hulme, E.C. The practical approach series. Oirl press y Oxford University press.
- 75.- Battaini-F; Elkabes-S; Bergamaschi-S; Ladisa-V; Lucchi-L; De-Graan-PN; Schuurman-T; Trabucchi- M; Govoni-S (1995). *Neurobiolo-Aging.* **16** (2):137-148.
- 76.- Croquet. F; Bréhier. A; Gil. S; Davy. J; Féger.J (1996). *Bioch. Bioph. Acta* **1315**:163-168.
- 77.- de Duve, et al (1974) in de Duve, C (1983). *Eur. J. Biochem.* **137**:391-397.
- 78.- Bylund, D.B; Eikenberg, D.C; Hieble, J.P; Langer, S. Z; Lefkowitz, R; Minneman, K.P; Molinoff, P. B; Ruffolo Jr. R.R; Trendelburg, U. *Pharmacological Rev.* 46(2): 121-136.