



03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

18  
29

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

“CARACTERIZACIÓN DEL SUBTIPO DE RECEPTOR  $\alpha_1$ -ADRENÉRGICO PRESENTE EN LAS MEMBRANAS DE HIGADO HUMANO Y DEL MONO RHEBUS (*Macaca mulata*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

(Inv. Biomedica Basica)  
P R E S E N T A :

Q.F.B. MA. TERESA ROMERO AVILA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

268527

1978



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.

### **Agradecimientos:**

Al Dr. J. Adolfo García-Sáinz. Por haberme permitido realizar este trabajo de tesis, por sus constantes muestras de lo que es el trabajo ordenado y siempre comprometido hacia la superación. Así como por la confianza y apoyo día con día.

A las Dras. Marcia Hiriart y Victoria Chagoya por ser parte de mi Comité Tutorial.

A los Doctores: Rolando Hernández Muñoz, Herminia Pasantes Morales, Rosario Muñoz-Clares, José Pedraza Chaverri y Carlos Rosales Ledezma por la revisión paciente y crítica de esta tesis.

A la Dra Claudia Gonzáles-Espinosa por la colaboración y revisión de este trabajo

A la profra Alejandra Peláez Gaytán por la revisión de esta Tesis además de su amistad a lo largo de estos años.

A mis amigas : Marina Macías, Claudia Gonzáles, Maru Torres, Luz del Carmen Medina, Mirella Rodríguez, Concepción Agundis, Graciela Romero, Alejandra Peláez

A mis compañeras y amigas del trabajo diario: Lupita Ramírez, Lupita Jiménez, Lupita Pérez por su constante apoyo para facilitarme el trabajo diario.

A Paco por la realización de las figuras de esta tesis.

Para todos mis compañeros del laboratorio porque cada día aprendemos algo nuevo, en el diario andar del trabajo.

Y para todas las personas que en este momento de apremio, he olvidado sin querer

GRACIAS

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Comunicación entre las células .....	1
Mecanismos generales de transducción de señales .....	2
Catecolaminas .....	6
Historia de los receptores adrenérgicos .....	8
Actualidad de los receptores adrenérgicos .....	9
Sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos/Ca <sup>2+</sup> .....	10
Proteínas G acopladas a receptores .....	12
Los receptores adrenérgicos acoplados a sus efectores .....	14
Clasificación farmacológica .....	19
<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
General .....	31
Particulares .....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
Reactivos .....	32
Material biológico .....	32
Procedimiento general de obtención de membranas. ....	33
Estudios de unión al ligando marcado radiactivamente "binding" .....	34
Tratamiento con cloroetilclonidina .....	35
Extracción de RNA .....	36
Procedimiento de RT-PCR .....	37
Ensayos de hibridación .....	38
"Northern blot" .....	38
Condiciones de hibridación .....	39
Autorradiografía .....	39
"Southern blot" .....	39
<b>Resultados</b>	<b>40</b>

Artículo I .....	40
Artículo II .....	40
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
Artículo I .....	51
Artículo II .....	52
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>

## INTRODUCCIÓN

### Comunicación entre las células

La capacidad para responder al medio ambiente que le rodea y el control de la entrada y salida de moléculas a través de la membrana plasmática es una característica fundamental de cualquier célula. Esta membrana es impermeable a compuestos como iones, moléculas inorgánicas, polipéptidos ó proteínas, por lo que para tener alguna influencia sobre la célula, las sustancias hidrofílicas necesitan interactuar con proteínas que se encuentran en la membrana plasmática, las cuales ayudan a regular la fisiología de la célula para hacer frente a estos cambios. Este es el inicio de un sistema de comunicación tanto hacia el exterior como al interior de la célula.

Al material extracelular ( ya sea moléculas inorgánicas o polipéptidos ) se le denomina **ligando**, la palabra que se utiliza de manera común para designar a un componente que une a una proteína para que realice una función.

La proteína (blanco) que se une al ligando es llamada **receptor**.

Las señales son transmitidas a través de moléculas capaces de actuar como mensajeros de éstas: las hormonas y neurotransmisores.

Las células que responden a estos primeros mensajeros denominadas **células blanco**, forman a su vez el **tejido blanco**; esto les permite responder a los diversos estímulos de una forma programada, coordinada y característica para cada uno de los diferentes mensajeros químicos.

Para establecer la comunicación hacia el interior de la célula es necesaria la existencia de moléculas que sirvan como intercomunicadores o **segundos mensajeros** que permiten difundir o propagar las señales para proporcionar una respuesta metabólica ó fisiológica. El proceso por medio del cual la señal extracelular es transmitida hacia el interior de la célula, generando una respuesta metabólica específica, es conocido como **sistema de transducción**. Este sistema

consta de varios componentes que actúan como mensajeros de la señal, entre ellos, los que son capaces de reconocer a dichos mensajeros, además de moléculas acopladoras que permiten el reconocimiento con las efectoras encargadas de la generación de la respuesta fisiológica. El sistema de transducción de señales puede visualizarse como una cascada amplificadora de la señal producida por los mensajeros químicos, mismas que se clasifican de acuerdo a su distribución. Por ejemplo:

a) **autacoides** o mediadores locales, actúan en células blanco muy cercanas o sobre ellas mismas en **comunicación parácrina y autócrina** respectivamente.

b) **hormonas**, que son liberadas al torrente sanguíneo por las glándulas, llevan la señal a las células blanco localizadas en lugares alejados del sitio de excreción de la hormona en **comunicación endócrina**.

c) **neurotransmisores**, liberados por las células nerviosas, formando uniones específicas denominadas sinapsis, además de establecer una comunicación entre la célula emisora y la célula receptora (presinapsis y postsinapsis).

De acuerdo a su naturaleza química, las hormonas pueden ser péptidos, aminos o esteroides, entre otras.

### **Mecanismos generales de transducción de señales**

La actividad de las hormonas se realiza a través de un reducido número de mecanismos similares entre sí. Como ejemplos pueden mencionarse el de epinefrina, insulina, neurotransmisores y esteroides, mismos que se describen a continuación.

La epinefrina se une a un receptor  $\beta$ -adrenérgico específico en la membrana plasmática de los miocitos y hepatocitos activando a una proteína  $G_s$ , la cual sirve de mediadora entre el receptor adrenérgico y el efector, que en este caso es la adenil ciclasa. Cuando el receptor  $\beta$ -adrenérgico es ocupado por la hormona se activa la enzima adenil ciclasa convirtiendo el adenosín trifosfato (ATP), en adenosín

monofosfato cíclico (AMPc), el segundo mensajero, el cual activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc. Esta proteína cinasa fosforila y activa a la fosforilasa cinasa **b** la cual, en pasos subsiguientes, fosforila y activa a la glucógeno fosforilasa la cual conduce finalmente a la liberación de glucosa. La enzima fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos termina la cascada de activación de la señal, promoviendo la conversión del AMPc en adenosín monofosfato (AMP). Mientras que la proteína cinasa dependiente de AMPc también fosforila y regula a un gran número de otras enzimas presentes en otros tejidos (Fig. 1).

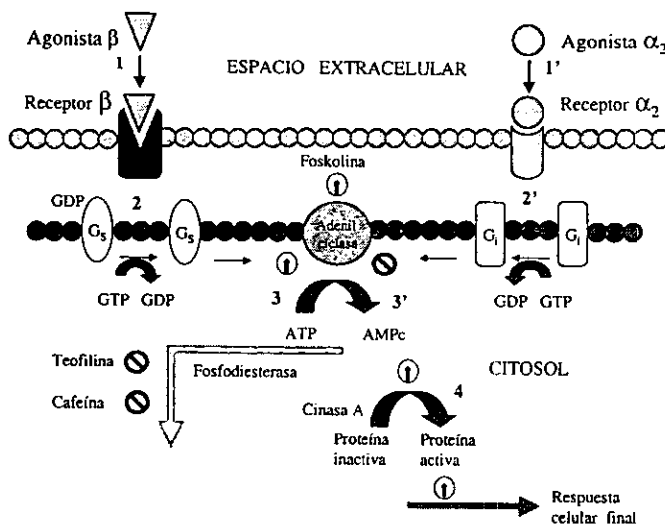


Fig. 1 Sistema de transducción de la adenil ciclasa.

Otro sistema de transducción de señales, es el que se activa por el acoplamiento de la hormona con el receptor vía otro grupo de proteínas G que interactúan con la fosfolipasa C (PLC), la hormona al unirse al receptor activa a la proteína G, que favorece la actividad de la PLC para que lleve a cabo la hidrólisis de un lípido de



membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bifosfato,  $PIP_2$  generando dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DG) y el fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato, el cual causa la liberación del  $Ca^{2+}$  almacenado en el retículo endoplásmico; que junto con el diacilglicerol activan a una cinasa muy importante, s la proteína cinasa C (PKC). dependiente de  $Ca^{2+}$  la cual genera la respuesta celular.(Fig. 2).

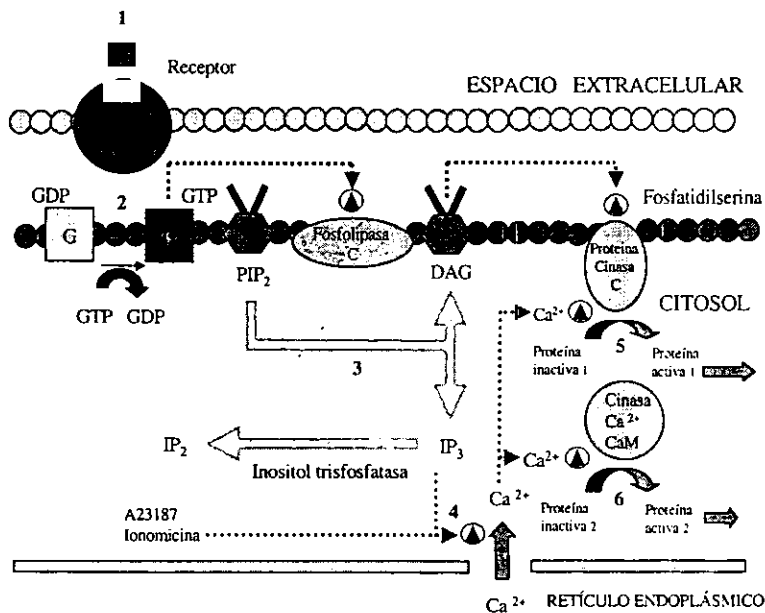


Fig. 2. Sistema de transducción del recambio de Fosfoinosítidos-Calcio.

El receptor de insulina representa otro sistema de transducción de señales. El receptor es una proteína integral de la membrana plasmática, formado por dos subunidades, que atraviesan la membrana y se encuentran unidas por puentes disulfuro. La unión de la insulina con el receptor se realiza con el dominio extracelular, activando a una tirosina cinasa específica que se encuentra en su dominio citoplásmico. Esta cinasa activa a otras proteínas cinasas por la fosforilación específica en residuos de tirosina. Las hormonas que tienen un sistema similar de transducir la señal son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento necrótico (NGF) (Fig. 3).

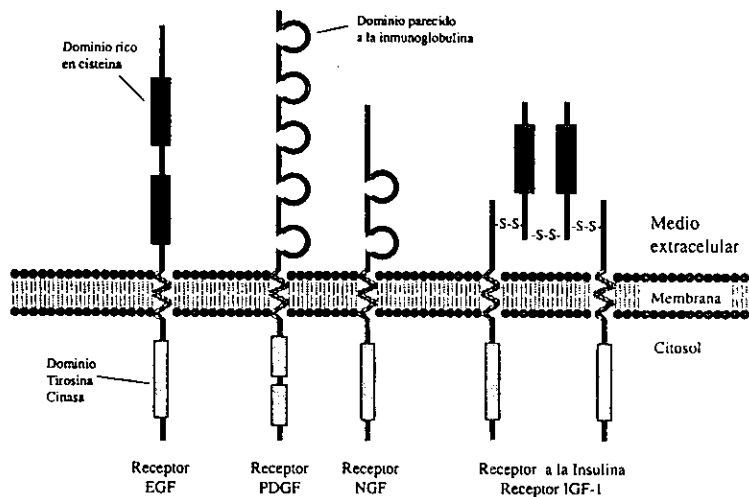


Fig. 3 Receptores con actividad de Tirosina cinasa.

Un cuarto grupo lo constituyen los que siguen el mecanismo de los neurotransmisores cuyos receptores son canales iónicos como el receptor nicotínico de la acetilcolina. Este mecanismo se lleva a cabo cuando el receptor es ocupado por la acetilcolina y permite el paso de iones  $\text{Na}^+$  a través de la membrana con la consecuente despolarización de la célula blanco.

Una forma más de señales la constituyen las hormonas de naturaleza lipídica, que pertenecen a la superfamilia de receptores a esteroides, dentro de ésta se encuentran las hormonas esteroides (estrógenos, progesterona, andrógenos, etc.) que son sintetizadas y secretadas por las células endócrinas.

Al igual que las anteriores las hormonas tiroideas, los retinoides y la vitamina D se difunden a través de la membrana plasmática uniéndose a un receptor específico; el complejo hormona-receptor se une a regiones específicas del DNA, llamados elementos de respuesta a hormonas, que regulan la expresión de genes cercanos (Tsai et al., 1994).

Por último se han observado también la existencia de moléculas que atraviesan fácilmente la membrana plasmática y además se encuentran acopladas al sistema de transducción de la guanilato ciclasa. El óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) pertenecer a este grupo de moléculas. El NO difunde rápidamente hacia afuera de la célula que lo produce y se introduce rápidamente a las células vecinas, su tiempo de vida media oscila entre 5-10 segundos, por lo que su acción es local. En muchas células blanco, como las células endoteliales, el NO reacciona con el grupo hemo (hierro) cercano al sitio activo de la enzima guanilato ciclasa, estimulando la producción del mediador intracelular GMPc (Lowenstein et al., 1992).

### **Catecolaminas**

Dentro de los agonistas que interactúan con los receptores adrenérgicos se tienen a las hormonas norepinefrina y epinefrina llamadas de manera general catecolaminas. Muchas de las acciones de los agonistas y antagonistas que activan o inhiben a los receptores adrenérgicos, se pueden entender en términos de las acciones fisiológicas de las catecolaminas sobre los tejidos o células. Dado que este trabajo se encuentra enfocado a la caracterización de los receptores adrenérgicos es conveniente ampliar este tema.

Las catecolaminas son liberadas por el sistema nervioso simpático y la médula espinal hacia el torrente sanguíneo donde se encuentran involucradas en la regulación de una gran cantidad de funciones fisiológicas, particularmente en la integración de respuestas asociadas al estrés. La norepinefrina es un neurotransmisor, mientras que la epinefrina es una hormona secretada por la médula espinal. La activación del sistema nervioso simpático ocurre en respuesta a diversos estímulos dentro de los que se incluyen la actividad física, la tensión psicológica, la pérdida de sangre y las

reacciones alérgicas; además de una gran cantidad de funciones entre las cuales se puede señalar la frecuencia cardíaca, la tensión arterial, la permeabilidad de la vía aérea bronquial, el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos.

El conjunto de respuestas fisiológicas y metabólicas que preceden a la estimulación de los nervios simpáticos en los mamíferos se encuentran mediadas en general por el neurotransmisor noradrenalina, aunque cotransmisores peptídicos pueden contribuir a potenciar estos efectos. Como parte de la respuesta al estrés, es estimulada también la médula suprarrenal, provocando una elevación de la concentración de epinefrina (llamada también adrenalina) y noradrenalina en la circulación.

Las catecolaminas naturales, epinefrina y norepinefrina, y las drogas que imitan sus acciones comprenden uno de los grupos más estudiados de agentes farmacológicos denominados agentes **adrenérgicos**. (Goodman & Gilman., 1996).

La mayoría de las acciones de las catecolaminas pueden clasificarse en siete grandes grupos: 1) la acción excitadora periférica sobre algunos tipos de músculo liso, como son los que se encuentran en los vasos sanguíneos que irrigan la piel y las mucosas y en las células glandulares; 2) la acción inhibitoria periférica sobre otros tipos de músculo liso como: la pared intestinal, el árbol bronquial y los vasos sanguíneos que irrigan el músculo esquelético; 3) la acción excitadora cardíaca, responsable del aumento en la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción; 4) las acciones metabólicas, como un aumento en la velocidad de la glucogenólisis en el músculo e hígado además de la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo; 5) las acciones endócrinas como: la modulación en la secreción de insulina, renina y hormonas hipofisarias; 6) las acciones sobre el sistema nervioso central como la estimulación respiratoria y, con algunas de las drogas, el insomnio, la actividad psicomotora y la reducción del apetito, y 7) las acciones presinápticas que producen inhibición o facilitan la liberación de neurotransmisores como noradrenalina y acetilcolina (Goodman & Gilman's 1996).

## Historia de los receptores adrenérgicos

Los primeros estudios acerca de los efectos de la adrenalina (epinefrina), la cual se considera la hormona representante de los agonistas adrenergicos, se realizaron en 1895 por Oliver y Schäfer en extractos suprarrenales donde se demostró su efecto presor. En 1899 Abel denominó al principio activo como adrenalina. En 1906, Dale utilizó el concepto de substancia receptora para explicar el mecanismo de acción de algunas sustancias sobre el sistema nervioso simpático, con ello fue posible explicar como los alcaloides del cornezuelo del centeno sólo inhibían las acciones excitadoras de la adrenalina, sin afectar su acción inhibitoria o las acciones excitadoras del bario. En 1921 Cannon y Uridil sugirieron que existía un solo tipo de receptor en diferentes células efectoras, que era capaz de inducir la liberación de sustancias excitadoras o inhibitorias: esto dependía de la célula efectora.

Pero en 1948 Ahlquist empleando tejidos de diferentes animales y varios compuestos, generalmente agonistas (epinefrina, norepinefrina, metil-norepinefrina, metil-epinefrina e isoproterenol), encontró que existía un orden de potencia para estimular la vaso dilatación y la estimulación del miocardio y otro para mediar la tensión arterial. Esto sirvió para observar que las diferencias se debían a la existencia de diferentes receptores. Definió como  $\alpha$  a aquellos que estaban involucrados en la mayoría de las respuestas estimuladoras y al menos una inhibitoria (relajación del músculo liso del intestino delgado) y como  $\beta$  a los asociados con la mayoría de las respuestas inhibitorias y al menos una estimuladora (contracción cardíaca). Esta es la primera clasificación que se realizó de los receptores adrenérgicos. La prueba final para este esquema de clasificación vino en 1957 con la descripción de que el agonista parcial dicloroisoprenalina era capaz de antagonizar la respuesta  $\beta$ -, pero no la  $\alpha$ - adrenérgica. (Goodman & Gilman., 1994).

Ya en 1967, Lands y colaboradores al comparar el orden de potencia de agonistas en un trabajo similar al de Ahlquist, concluyeron que había al menos dos subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. El receptor  $\beta_1$ -adrenérgico que se encontraba predominantemente en el corazón y en el tejido adiposo mostraba ser igual de

sensible a noradrenalina y epinefrina. En cambio el  $\beta_2$ -adrenérgico era el responsable de la relajación vascular uterina siendo menos sensible a noradrenalina que a la epinefrina.

A principios de los 70s se encontró que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en las pre- y postsinapsis mostraban diferencias farmacológicas (Langer, 1974) sugiriéndose la designación de  $\alpha_2$  y  $\alpha_1$  para los receptores presentes en las pre- y postsinapsis, respectivamente.

Muchos estudios posteriores se han desarrollado para la identificación y clasificación de los receptores adrenérgicos empleando agonistas y antagonistas, siendo los antagonistas cada vez más empleados en la clasificación farmacológica debido a que resultan ser más selectivos para distinguir entre cada subtipo de receptor.

Aunado al desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas y técnicas de biología molecular que han ayudado al estudio de las interacciones hormona receptor.

### **Actualidad de los receptores adrenérgicos**

Fain y García-Sáinz en 1980 definen que existen tres principales familias de receptores adrenérgicos los  $\alpha_1$ , los  $\alpha_2$  y los  $\beta$ -adrenérgicos. Ahora se conoce que cada una de estas incluye diferentes subtipos de receptores, de esta forma, para los  $\alpha_1$  se ha aceptado la existencia de al menos tres subtipos ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ ), mientras que los  $\alpha_2$  se han clasificado a su vez en tres ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) y finalmente los  $\beta$  presentan también tres subtipos ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ).

Estas divisiones han sido propuestas con base en su especificidad a diversos fármacos, a la similitud que presentan en sus secuencias primarias (clonación), así como a los distintos sistemas de transducción a los cuales se acoplan cada uno de ellos. Un ejemplo lo muestran los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se encuentran acoplados principalmente a la estimulación de la adenil ciclasa, los  $\alpha_2$ -adrenérgicos que están acoplados de tal forma que inhiben la acción del sistema antes mencionado

y, finalmente, los  $\alpha_1$ -adrenérgicos se acoplan a la estimulación del sistema de recambio de Fosfoinosítidos-Calcio.

### **Sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos/ $\text{Ca}^{2+}$**

Como se ha visto a lo largo de la introducción, los receptores adrenérgicos se han dividido en tres grandes familias:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , y  $\beta$ - adrenérgicas. Esta división fue sugerida por las observaciones realizadas en cuanto al mecanismo de transducción al cual se encuentran acoplados (Fain y García-Sáinz., 1980) incluidos en la superfamilia de receptores de siete dominios transmembranales que se encuentran asociados a proteínas G de las familias  $G_q$  y  $G_{i/o}$ .

De esta forma los diferentes tipos de receptores adrenérgicos se encuentran asociados a diferentes tipos de proteínas G, así por ejemplo, los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos y los  $\beta$  adrenérgicos se encuentran asociados al sistema de la adenil ciclasa (estimuladora e inhibitoria respectivamente) mediante proteínas G, los  $\alpha_2$  se acoplan a  $G_i$  y los  $\beta$  a  $G_s$ .

En cambio, la activación de todos los subtipos conocidos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos producen un incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este puede ser el resultado de la liberación de los almacenes intracelulares del ión, involucrando un mecanismo en el que participa una proteína G de la familia de  $G_q$ , siendo la subunidad  $G_{qa}$  la que directamente interactúa con la fosfolipasa C (PLC).

Esta enzima hidroliza al fosfatidil-inositol 4,5-difosfato (su sustrato específico), un lípido de membrana que al ser hidrolizado genera dos segundos mensajeros: el inositol 1,4,5- trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y el diacilglicerol, ( DG ) (Fig. 4). Éste, junto con el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado del retículo endoplásmico promovido por el  $\text{IP}_3$ , activan a la proteína cinasa C (PKC) unida a la membrana. Al ser activada inicia una cascada de fosforilaciones específicas en proteínas con residuos de serina y treonina que son blancos de esta enzima (ver Fig. 2).

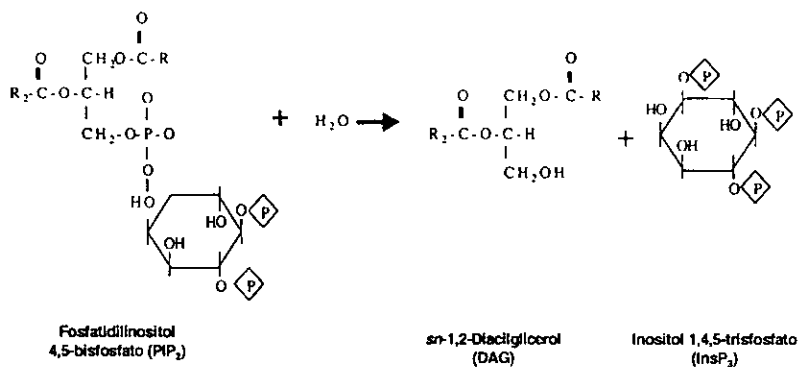


Fig.4. Reacción de la PLC sobre el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato

A continuación se presenta una tabla que muestra algunos de los procesos celulares que son controlados por este sistema.

Tabla 1. Algunos procesos controlados por los segundos mensajeros producidos por el sistema de fosfoinosítidos / Ca<sup>2+</sup>.

Señal externa	Tejido Blanco	Respuesta Celular
Acetilcolina	Páncreas	Secreción de amilasa
Acetilcolina	Células b del páncreas	Secreción de insulina
Acetilcolina	Músculo liso	Contracción
Vasopresina	Hígado	Degradación del glucógeno
Trombina	Plaquetas	Agregación plaquetaria
Antígenos	Linfocitos	Síntesis de DNA
Antígenos	Mastocitos	Secreción de histamina
Factores de crecimiento	Fibroblastos	Síntesis de DNA
Luz	Fotoreceptores ( <i>Limulus</i> )	Fototransducción
Espermatozoide	Huevos de erizo de mar	Fecundación
Hormona liberadora de tirotrópina	Lóbulo anterior de la glándula pituitaria	Secreción de protactina

Adaptado de M.J. Berridge, Sci. Am. (1985). Oct.127-147.



## Proteínas G acopladas a receptores

Otras moléculas importantes en el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio son las **proteínas G** que pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasa, dentro de las cuales se pueden distinguir dos grandes grupos de proteínas acopladas a distintos sistemas de transducción de señales: las proteínas G de bajo peso molecular como Ras, que participa en diversas vías de transducción de señales que llevan a la proliferación celular (Burgering et al., 1995); Rho, proteína que se encuentra implicada en la estructura celular modificando de forma activa las estructuras del citoesqueleto de actina ante los diferentes estímulos extracelulares (Fisher, et al., 1994) y la proteína Rab que participa en la movilización de vesículas intracelulares (Fisher et al., 1994) y también en la movilización de algunos factores importantes para la síntesis de proteínas.

El otro grupo lo forma la familia de las proteínas G heterotriméricas, que se encuentra constituido por una gran cantidad de miembros, los cuales coordinan la generación de diferentes señales intracelulares, en respuesta a la activación de los receptores membranales de la superfamilia de siete dominios transmembranales. Las proteínas G están formadas por tres diferentes subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aunque se sabe que existen cuando menos veinte tipos diferentes de la subunidad  $\alpha$ , cinco diferentes subunidades  $\beta$  y doce subunidades  $\gamma$  por lo que las múltiples combinaciones que se puedan dar resultarían en una gran cantidad de complejos heterotriméricos diferentes. Su distribución a nivel de tejidos y en la célula es variable logrando hacer aún más selectiva la regulación de la señales. Este grupo de proteínas heterotriméricas fueron las primeras implicadas en la regulación de la fosfolipasa C, Experimentos donde se utilizaban análogos de GTP para ver el rompimiento de fosfatidil inositol 1,4-bisfosfato (Lee et al., 1993) llevados a cabo en células permeabilizadas y en membranas aisladas mostraron la interacción con el GTP. Otros estudios realizados con la *toxina pertussis* mostraban que existía un mecanismo de activación por el agonista diferente, ya que uno era sensible y otro insensible al ser pretratadas las células con esta toxina, la que dependían del agonista y/o el tejido

tratado (Boyer et al., 1984). La identificación de la proteína G específica involucrada fue descubierta en 1990-91 (Taylor et al., 1991), demostrándose que una proteína de 42 kD, purificada de membranas de hígado tratadas con GTP $\gamma$ -S, activaban a la fosfolipasa C parcialmente purificada. Mediante análisis tipo "Western blot" se identificó como una subunidad de la proteína G la subunidad  $\alpha$ . Otros autores demostraron también que una proteína de 42 kD activaba a la PLC en cerebro (Smrcka et al., 1993). Los péptidos derivados de estas proteínas mostraban secuencias idénticas a las clonadas a partir de cDNAs de cerebro de ratón (Strathmann et al., 1990) a las que se designaron como  $\alpha_q$  y  $\alpha_{11}$ . Además, anticuerpos dirigidos contra secuencias de estos péptidos demostraron que éstas se encontraban presentes en hígado y en cerebro de rata.

En experimentos realizados en el laboratorio del Dr. Harden se demostró la presencia de una proteína de 43 kD en membranas de eritrocitos de pavo que activaban a la PLC sobre la hidrólisis de fosfatos de inositol trabajos de este mismo laboratorio (Dr. Harden) demostraron más tarde por análisis de la secuencia y por "Western blot" (Maurice et al., 1993) que se trataba de una proteína G.

Hasta el momento se sabe de la existencia de proteínas G insensibles a la ADP-ribosilación por *toxina pertussis* que también regulan la actividad de la PLC, conocidas como miembros de la familia  $G_q$ . Esta familia de proteínas G tiene, además de  $G_q$ , a  $G_{11}$ ,  $G_{14}$  y  $G_{16}$ ; su subunidad  $\alpha$  tiene una identidad de menos del 50% comparada con otras subunidades  $\alpha$  de otras proteínas G. Las proteínas  $G_q$  y  $G_{11}$  se encuentran ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos (Pang et al., 1990).

Sin embargo, en los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos el acoplamiento a sus efectores intracelulares y la selectividad mostrada por los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos para las diferentes proteínas G no se han definido claramente. Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos predominantemente se acoplan a proteínas G insensibles a la acción de *toxina pertussis* básicamente la familia  $G_{q/11}$ . Existe evidencia que demuestra selectividad entre los diferentes subtipos de receptores ya que se acoplan a diferentes miembros de esta familia. Por ejemplo,  $G_q$ ,  $G_{11}$ ,  $G_{14}$  y  $G_{16}$  pueden mediar el

recambio de fosfoinosítidos por el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, pero el receptor  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico está acoplado únicamente vía  $G_q$  ó  $G_{11}$  a este sistema (Wu et al., 1992). También se ha demostrado en tejidos intactos (Nebigil et al., 1992), y en modelos de expresión eucariotes, que los subtipos pueden activar múltiples efectores acoplándose a vías sensibles o insensibles al efecto de la *toxina pertussis*.

### **Los receptores adrenérgicos acoplados a sus efectores**

Como ya se mencionó todos los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se acoplan de forma estimuladora al sistema de recambio de fosfoinosítidos- $Ca^{2+}$  (Ver fig. 2). La fosfolipasa C (PLC) juega un papel importante mediando la acción celular de muchas hormonas, neurotransmisores y algunos factores de crecimiento. La activación producida por el agonista activa a la PLC. Se han descubierto varios subtipos de enzimas que pueden catalizar la misma reacción. Además, existen muchas formas distintas de PLCs en diferentes tejidos de mamíferos aunado a la clonación de algunas de estas enzimas y basándose en el tamaño molecular, inmunorreactividad y predicción de las secuencias de aminoácidos se han descrito tres clases: PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  y PLC- $\delta$ .

La subsecuente clonación de isoenzimas que presentan similitudes estructurales entre cada una de las diferentes clases ha hecho que se clasifiquen en subtipos de PLC. De esta forma se han descrito la PLC- $\beta_1$ , PLC- $\beta_2$ , PLC- $\beta_3$  y PLC- $\beta_4$ , PLC- $\gamma_1$ , PLC- $\gamma_2$ , PLC- $\delta_1$  y PLC- $\delta_3$ , las cuales presentan un porcentaje de homología de 21-56 % entre sus secuencias.

De esta manera, la movilización de  $Ca^{2+}$  de los almacenes intracelulares, así como el influjo del  $Ca^{2+}$  extracelular, se ve aumentado por la activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos vía los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles e insensibles a voltaje (Minneman 1984; Minneman 1994). Inicialmente se pensaba que esto podría ser una forma de distinguir entre los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y de esta manera clasificarlos empleando bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$ , como la dihidropiridina que

inhibe al  $\alpha_{1a}$ - pero no al  $\alpha_{1b}$ - que media la contracción en músculo liso aislado (Han et al., 1984).

Sin embargo, el subtipo  $\alpha_{1a}$ -adrenérgico se postuló para acoplarse ampliamente al influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, mientras que para el  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico parecía ser que esta movilización era del calcio intracelular promovido por el  $IP_3$ .

Con la clonación de los receptores y el uso de líneas celulares, existen múltiples evidencias de excepciones en la forma de acoplamiento. Por ejemplo, se ha observado que los  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos se encuentran acoplados al influjo de calcio en la vena cava de rata y en células MDCK-D<sub>1</sub>. (Klij et al., 1991). En otros experimentos en los que los receptores se expresaron en células COS-1 se demostró que los tres subtipos de receptores podían movilizar el calcio intracelular e incrementar el influjo del mismo vía los canales de calcio sensibles a voltaje (Lomasney et al., 1993; Pérez et al., 1993).

En resumen, los tres subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos expresados en células COS-1 o en fibroblastos pueden acoplarse no únicamente a la PLC, sino también a la  $PLA_2$  y la PLD, además de promover la producción de AMPc. Este último efecto es debido a que la PKC potencia la actividad de la adenil ciclasa (Pérez et al., 1993). Por lo que se ha llegado a la conclusión de que los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pueden acoplarse tanto a diferentes proteínas G como a efectores de manera directa o indirecta dependiendo del tejido o el tipo celular. En la tabla 2 se resumen los procesos mediados por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Tabla 2. Procesos mediados por la señal de transducción de los  $\alpha 1$ -adrenérgicos

Proceso	Proteínas G	Efectores de membrana
Recambio de fosfoinosítidos calcio	G <sub>q</sub> , G <sub>11</sub> , G <sub>14</sub> , G <sub>16</sub>	PLC
Influjo de Calcio	G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub> (sensibles a TPX)	Canales de Ca <sup>2+</sup>
Liberación de ac. Araquidónico	G <sub>i</sub> , G <sub>o</sub> (sensibles a TPX)	PLA <sub>2</sub> , PLD, PLC
Hidrólisis de PC	G	PLD, PLC
Acumulación de AMPc	G <sub>i</sub>	PKC

Tomado de García-Sainz 1993. *Cellular Signaling* 5:542.

Todas las secuencias de aminoácidos de los receptores acoplados a proteínas G presentan una distribución de siete regiones hidrofóbicas, que forman dominios transmembranales, conectados por asas hidrofílicas alternadas intracelulares y extracelulares Fig.5.

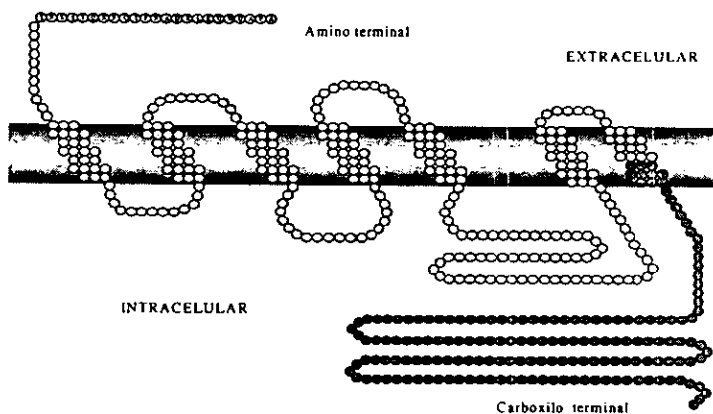


Fig. 5. Receptor  $\alpha 1$ -adrenérgico

El análisis por mutaciones de varios receptores que pertenecen a la familia de siete dominios transmembranales han revelado una organización similar en sus dominios funcionales. Mientras que los dominios transmembranales contribuyen a la formación de la bolsa de unión para el ligando. La secuencia de aminoácidos de la asa intracelular parece mediar el acoplamiento receptor-proteína G (Savarase et al.,

1992), pero aún es poco conocido como la unión de la señal extracelular es convertida en la activación del receptor.

Tratando de averiguar que parte del receptor es el que se encuentra involucrado en la interacción con la proteína G se han llevado a cabo estudios con receptores adrenérgicos, colinérgicos y otros receptores en los que se ha visto que la tercera asa citoplásmica parece ser crítica para la interacción con la proteína G (Kobilka., 1992), con alguna contribución de la segunda asa citoplásmica y el extremo carboxilo (Savarese et al., 1992).

La importancia de la segunda asa se basa en estudios realizados activando a la adenil ciclasa y/o PI-PLC, empleando la construcción de quimeras en las cuales ésta y otros dominios se han cambiado, o en otros experimentos en donde se realizaron mutaciones en este dominio. La gran mayoría de los estudios realizados se han desarrollado en dominios de receptores que involucran el acoplamiento de  $G_q$  o  $G_i$  a receptores adrenérgicos y muscarínicos.

Las quimeras construidas con la sustitución de la tercera asa citoplásmica del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico por la del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico fueron capaces de mediar la activación de la PLC-PI por el agonista epinefrina (Cotecchia et al., 1990).

Otros estudios que confirman la importancia de este dominio, el cual tiene la información crítica para el acoplamiento, fueron hechos al realizar mutaciones en dos aminoácidos (Ala<sup>293</sup> por Leu y Lys<sup>290</sup> por His) en la tercera asa del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico. El resultado fue un gran incremento en la activación de la hidrólisis del PI por catecolaminas (Cotecchia et al., 1990). Para el caso de la alanina 293, cualquiera de los aminoácidos posibles de intercambiar fueron capaces de activar constitutivamente al sistema, además de incrementar la afinidad del agonista por el receptor (Kjelsberg et al., 1992).

En estudios realizados con quimeras construidas con el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico con la tercera asa citoplásmica de receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico se han identificado a los residuos 233 al 259 en la porción amino terminal como la determinante estructural que permite la activación de la PLC. Sin embargo, un receptor  $\beta_2$  que contiene esta

secuencia es capaz de activar a la adenil ciclasa (Cotecchia et al., 1992), indicando que otros dominios son requeridos para determinar la selectividad.

Estudios mutagénicos análogos con los receptores muscarínicos  $M_1$ ,  $M_2$  o  $M_3$ , han permitido identificar a la tercera asa citoplasmática como la determinante estructural principal para la selectividad entre  $G_q$  y  $G_i$ , aunque residuos situados en la segunda asa se han identificado como importantes en el acoplamiento con las proteínas G.

Otros aspectos importantes que se han considerado son las interacciones existentes entre el ligando y receptor, postulando que la unión con el agonista hace que las asas implicadas queden más expuestas o que los cambios conformacionales favorezcan la transducción de la señal. La unión del ligando a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos parece ser dentro de los dominios unidos a la membrana; en contraste, los receptores para las hormonas peptídicas parecen unirse a su ligando en los dominios extracelulares (Feng et al., 1995).

Todos los receptores adrenérgicos contienen residuos altamente conservados dentro de sus sitios de unión a los agonistas. Las regiones transmembranales de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se acomodan en un arreglo yuxtapuesto formando el sitio de unión para la catecolaminas que tienen una naturaleza hidrofílica. Sin embargo, el sitio de unión al ligando es distinta para cada uno de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, ya que pueden discriminar entre una gran variedad de agonistas y antagonistas sintéticos (Hwa et al., 1995).

En trabajos realizados con el sistema de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos se logró establecer los residuos involucrados en la unión de los ligandos naturales epinefrina y norepinefrina. Por lo que se podría extrapolar y pensar que estas interacciones pudieran darse también en los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos puesto que todos ellos se unen a sus hormonas naturales con una afinidad muy similar, y además, tienen su secuencia de aminoácidos muy conservada.

En particular, un residuo de ácido aspártico ( $Asp^{111}$  en el  $\beta_2$ -adrenérgico) en el tercer dominio transmembranal se encuentra involucrado en la formación de un

puente salino con el grupo amino protonado de la catecolamina (Strader et al., 1987). Este aspártico también se encuentra involucrado en la unión del agonista en los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Wang et al., 1991). Pero la unión de las catecolaminas para los  $\alpha_1$ -adrenérgicos parece que ocurre de una manera diferente a la de los  $\beta_2$ -adrenérgicos (Perez et al., 1996). Dos residuos de serina (Ser<sup>188</sup> y Ser<sup>192</sup>) en el quinto dominio transmembranal del receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico son, en parte, responsables de la unión del agonista así como de la afinidad de este subtipo de receptor. Sin embargo, para la actividad total del agonista, todo parece indicar que sólo es importante la Ser<sup>188</sup> y parece ser igual para los otros dos subtipos de receptores ( $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos y  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos).

Pero se tienen datos que indican que los tres subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos tienen una serina localizada en una posición análoga en el residuo 189 en el  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico (Ser<sup>208</sup> en el  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico o la serina equivalente la 204 en el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico). La mutación de una serina por una Ala en la posición 208 en el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico no tiene efecto sobre la afinidad para la unión o por la actividad funcional de este receptor. Pero las dos serinas importantes involucradas en la unión de las catecolaminas con los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos se encuentran localizadas formando parte de la  $\alpha$  hélice, mientras que en el  $\beta_2$ -adrenérgico, las serinas se encuentran localizadas en dos residuos aparte.

### Clasificación farmacológica

Al inicio de la clasificación de la familia de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos existían dos subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$ - por su mayor afinidad a la fentolamina y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos con menor afinidad por este ligando. Basándose en las diferencias farmacológicas que presentaban en su trabajo Morrow y Creess en 1986, reportaron que en corteza cerebral de rata el WB4101 tritiado se unía a dos lugares diferentes, aproximadamente en una proporción igual de sitios: uno de alta ( $\alpha_{1A}$ ) y otro de baja afinidad ( $\alpha_{1B}$ ). Además en corteza cerebral de rata e hipocampo el WB4101 se unía a dos sitios con afinidades distintas, una en el rango picomolar y el otro en el



rango nanomolar, respectivamente. De hecho, el WB4101 mostraba una mayor afinidad por el  $\alpha_{1A}$  que por el  $\alpha_{1R}$  (Morrow et al., 1986)

Otro compuesto utilizado para definir los subtipo de receptores  $\alpha_1$  fue la cloroetilclonidina (CEC), un reactivo derivado de la clonidina. Este compuesto inactivaba de forma selectiva a una subpoblación de receptores (35-40%) los cuales se unían al ligando marcado [  $^{125}$ I ] IBE 2254 (HEAT) en corteza cerebral de rata . Estudios realizados por Han en 1987, demostraban claramente que existía una inactivación de los receptores adrenérgicos: altas concentraciones de CEC causaban la inhibición de la unión específica del [  $^{125}$ I ] IBE 2254 de agonistas y antagonistas tanto en hígado como en riñón. Los receptores adrenérgicos de hipocampo y vasos deferentes son insensibles a la CEC, lo que sugería claramente la presencia de al menos dos subtipos diferentes de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en tejidos de mamíferos. Uno de los cuales era inactivado por la cloroetilclonidina, al que se le denominó subtipo  $\alpha_{1B}$ , y el otro insensible definido como subtipo  $\alpha_{1A}$  (Han y Minneman, 1987).

La farmacología del receptor recombinante clasificado como  $\alpha_{1c}$ , demostró ser muy similar a la encontrada para el subtipo  $\alpha_{1A}$  nativo, con la excepción de la sensibilidad a CEC (Thomas et al., 1994).

Utilizando las técnicas de biología molecular como el análisis de Northern blot y ensayos de protección a RNAsas, en las que se emplearon sondas específicas para cada uno de los subtipos de receptores clonados, se demostró la presencia del subtipo clasificado  $\alpha_{1c}$  en cada uno de los tejidos de rata en donde se había identificado previamente por datos farmacológicos como  $\alpha_{1a}$ . (Pérez et al., 1994).

Las diferencias mostradas en cuanto a sensibilidad a CEC por los receptores recombinantes y por los receptores localizados en otros tipos de células o tejidos, se pueden explicar con base a las variaciones experimentales en la realización de los ensayos, aunadas a las características de cada una de las membranas plasmáticas en las que se realizan las determinaciones (Guarino et al., 1996).

Otro compuesto que ha tenido gran relevancia en la clasificación farmacológica de los receptores adrenérgicos es, sin duda, el 5-metil-urapidil el cual fue descrito por Gross en 1988. Resultando ser más selectivo para el subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico que el WB 4101 (Gross et al., 1988), por lo que se podía discriminar mejor entre los dos subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$ - y  $\alpha_{1B}$ - adrenérgicos. Este compuesto se ha empleado para la clasificación farmacológica y bioquímica de subtipos de receptores en hígado, hipocampo, vasos deferentes, corazón, riñón (Hanft et al., 1989) y aorta (Torres-Márquez et al., 1990).

El 5-metil-urapidil marcado con tritio se ha utilizado en estudios de asociación de ligando radiactivo para identificar los subtipos de receptores presentes en cerebro, corazón, riñón y glándula submaxilar en rata (Gross et al., 1988). Se han llevado a cabo otras investigaciones en diferentes especies, empleando este compuesto para la clasificación del subtipo de receptor adrenérgico, como los llevados a cabo en el laboratorio del Dr. García-Sáinz, en los que se encontró que el receptor de hígado de cuyo pertenece al subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico (García-Sáinz et al., 1992a, 1993a). El de hígado de conejo se clasificó como  $\alpha_{1C}$ -adrenérgico (hoy  $\alpha_{1A}$ ) (García-Sáinz et al., 1992b, 1995c, Tadei et al., 1993). Este compuesto muestra una afinidad mayor de por lo menos 100 veces por el receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico que por los  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (García-Sáinz et al., 1993a). Al igual que la dihidropiridina, (+) niguldipina, mostró ser un antagonista más selectivo para los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos (Boer et al., 1989; Hanft et al., 1989; García-Sáinz et al., 1993a).

Algunos agonistas, como la metoxamina y oximetaxolina, han sido empleados para mostrar que existen claras diferencias en cuanto a la activación de los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Se observó que ambos compuestos presentan una mayor afinidad por los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos que por los  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1985; Torres-Márquez et al., 1991; García-Sáinz et al., 1993a).

A continuación se presenta una tabla con los valores de afinidades obtenidas para los compuestos más empleados para la clasificación farmacológica.

Tabla 2. Valores de afinidades para los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos clonados

subtipo	$\alpha_{1a}$	$\alpha_{1b}$	$\alpha_{1d}$
nombre anterior	$\alpha_{1a}$	$\alpha_{1b}$	$\alpha_{1d}, \alpha_{1a/d}$
5-metil-urapidil	$8.63 \pm 0.32$	$6.97 \pm 0.50$	$7.31 \pm 0.66$
metoxamina	$4.29 \pm 0.75$	$3.36 \pm 0.67$	$4.33 \pm 0.61$
(+) niguldipina	$8.57 \pm 1.12$	$6.84 \pm 0.75$	$6.55 \pm 0.43$
Noradrenalina	$5.00 \pm 0.54$	$5.35 \pm 0.42$	$6.55 \pm 0.43$
Oximetaxolina	$7.53 \pm 0.43$	$6.50 \pm 0.48$	$5.81 \pm 0.51$
Fentolamina	$8.17 \pm 0.49$	$7.20 \pm 0.36$	$7.48 \pm 0.42$
Prasozina	$9.52 \pm 0.38$	$9.79 \pm 0.38$	$9.63 \pm 0.40$
WB4101	$9.32 \pm 0.32$	$8.01 \pm 0.44$	$8.83 \pm 0.42 \pm$

Tomado de Michel, M.C. et al., 1994.

Es claro que el desarrollo de estos compuestos han sido de gran utilidad, no sólo para la identificación y clasificación farmacología del subtipo de receptor, sino además para observar las diferencias bioquímicas de los subtipos. Las técnicas bioquímicas y de biología molecular utilizadas para el estudio y clasificación de los receptores han contribuido en gran parte a la clasificación. A continuación se mencionan algunas de las evidencias bioquímicas y de biología molecular reportadas para los receptores adrenérgicos. En estudios de parámetros fisiológicos realizados en el laboratorio se encontró que en el hígado, los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos son capaces de estimular la ureogénesis (Corvera y García-Sáinz, 1981), y la glucogenólisis (Corvera y García- Sáinz 1983).

En el músculo liso estos compuestos estimulaban la contracción (Villalobos-Molina et al., 1982), pero algunos resultados no eran fácilmente explicados por la presencia de un solo tipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico por lo que se sugería la existencia de subtipos de receptores y/o más de un mecanismos de transducción de la señal.

Los estudios realizados con las hormonas angiotensina II y vasopresina que comparten el mismo mecanismo de transducción que los  $\alpha_1$ -adrenérgicos mostraban claras evidencias que sugerían la existencia de diferentes poblaciones de receptores

$\alpha_1$ -adrenérgicos, los cuales parecían no tener el mismo sistema de transducción de la señal hormonal. De esta forma se pueden citar los siguientes hallazgos:

i) El efecto producido por las hormonas vasopresina, angiotensina II y el ionóforo A23187 sobre la glucogenólisis es menor en los hepatocitos de ratas que presentan hipotiroidismo, no así en los de ratas normales, sin embargo la respuesta por agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (epinefrina) no se afecta (Corvera y García-Sáinz, 1983).

ii) En los estudios realizados con cicloheximida se observó que esta era capaz de producir acciones similares a la de los agentes  $\alpha_1$ -adrenérgicos (como la estimulación de glucogenólisis, gluconeogénesis y ureogénesis), las cuales fueron bloqueadas por la prazosina un antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico (Huerta-Bahena et al, 1982).

iii) La insulina produjo un efecto antagónico a las acciones producidas por los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos pero no las producidas por las hormonas vasopresina o angiotensina II (Pushpendran et al., 1984).

iv) Los ésteres de forbol son capaces de inducir la desensibilización a la respuesta  $\alpha_1$ -adrenérgica, pero no a la respuesta a vasopresina y angiotensina II, estas hormonas se acoplan al mismo sistema de transducción (García-Sáinz et al., 1984). Además, los ésteres de forbol inhiben a la glucogenólisis estimulada por los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos, pero no la de angiotensina II o vasopresina (Corvera y García-Sáinz, 1984).

v) Las diferencias encontradas en hígado y aorta con los agonistas metoxamina y oximetazolina, compuestos selectivos para activar a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, se observó que la oximetazolina actúa como agonista parcial en la aorta, mientras que en hígado no producían ningún efecto y la metoxamina no provocó ningún efecto en la activación de los hepatocitos de rata (García-Sáinz et al., 1985).

Estos datos resultan congruentes con los sugeridos por el grupo de Ruffolo en 1982 en los experimentos realizados en aortas de diferentes especies de mamíferos que mostraban un rango amplio de afinidades para los agonistas y antagonistas de los

$\alpha_1$ -adrenérgicos con lo cual, proponían la presencia de dos o más tipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en un mismo tejido compartiendo la idea de heterogeneidad (Ruffolo et al., 1982)

Las técnicas de biología molecular han contribuido al estudio de estos receptores. El primer subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico clonado fue el  $\alpha_{1B}$ , aislado de una línea celular derivada de vasos deferentes de hámster (DDT1MF-2), con una secuencia de nucleótidos que codificaban para una proteína que se acopla a una proteína G (Cotecchia et al., 1988). Al expresar este cDNA, resultó una proteína que tenía propiedades muy similares al receptor  $\alpha_{1B}$ . Su clasificación farmacológica empleando la técnica de unión a un ligando marcado radiactivamente, mostró una baja afinidad por el agonista oximetazolina, y por los antagonistas WB4101, fentolamina, 5-metilurapidil y yohimbina. En contraste se reportó una alta afinidad por la prazosina y una alta sensibilidad a la inactivación irreversible por la cloroetilclonidina (Cotecchia et al., 1988). Aprovechando este hallazgo se utilizó este cDNA derivado del receptor de hámster como sonda, para que otros investigadores identificaran con ella al receptor presente en el hígado de rata, encontrándose que pertenecía al subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico y mostrando un perfil farmacológico muy similar y característico para el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico clonado, además de una similitud cercana al 98% en su secuencia de aminoácidos comparada con la del receptor de hámster. (Lomasney et al., 1991). Estudios con la técnica Northern en tejidos de rata mostraron que la expresión de RNAm para esta clona está presente en varios tejidos como el hígado, riñón, corazón y corteza cerebral que expresan el  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico. El receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico de humano se clonó en 1992 y su perfil farmacológico es muy similar al receptor clonado de células de hámster (Ramarao et al., 1992).

Siguiendo con esta línea de investigación, al emplear una sonda derivada del receptor de hámster  $\alpha_{1B}$ , se realizó una selección a partir de una biblioteca genómica construida de un cDNA de corteza cerebral de rata se aisló una clona que al parecer codificaba para un nuevo subtipo de receptor adrenérgico. La proteína expresada por

esta clona era distinta a la del subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico presentando una similitud del 65% en su secuencia de aminoácidos, además, perfil farmacológico distinto al de cualquiera de los  $\alpha_{1B}$  o  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos reportados, mostrando una afinidad relativamente alta por el 5-metil-urapidil y WB4101. Y una sensibilidad alta al tratamiento con cloroetilclonidina (CEC). Debido a este perfil farmacológico y a su baja similitud en su secuencia de nucleótidos este receptor fue designado como  $\alpha_{1C}$ -adrenérgico (Schwinn et al., 1990).

Continuando con la identificación de los subtipos de receptores adrenérgicos, Lomasney et al. en 1991 reportó el aislamiento de un cDNA que codifica para un posible  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico. Sin embargo, un trabajo paralelo al anterior, realizado por Dianne Pérez mostraba una secuencia similar que solo difería en dos codones y fue designado como  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico (Perez et al., 1991).

La clonación y expresión del receptor  $\alpha_{1C}$ -adrenérgico fue reportado por Forray 1992 y Hirasawa en 1993.

El análisis de hidropatía ha establecido que en la región transmembranal de los receptores adrenérgicos existen entre 20 y 25 aminoácidos que constituyen cada uno los dominios hidrofóbicos, que además se encuentran separados por residuos hidrofílicos. Este constituye un patrón característico de todos los receptores unidos a proteínas G. Estas regiones son las que se encuentran más conservadas, mientras que las regiones amino terminal, carboxilo terminal, así como la tercera asa intracelular, son las regiones más variables en cuanto a su secuencias de aminoácidos. Todos los receptores adrenérgicos se unen al mismo ligando endógeno por lo que se ha propuesto que estas regiones altamente conservadas sean las que se encuentren implicadas en el pegado o interacción con los ligandos naturales (-) epinefrina y norepinefrina. En cambio, una de las regiones más variables como la tercera asa intracelular se ha propuesto que sea la que permita el acoplamiento con las diferentes proteínas G (Lomasney et al., 1991).

Estudios con mutaciones dirigidas, con construcción de quimeras con los subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , han permitido detectar a los aminoácidos implicados en la interacción con los ligandos (Hwa, et al., 1995).

En algunos trabajos realizados con el receptor  $\beta$ -adrenérgico, se sugiere que los antagonistas se unen en un lugar similar a los agonistas debido probablemente a que muchos de los antagonistas han sido diseñados o sintetizados a partir de las estructuras de los agonistas. Pero los antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos no presentan gran similitud entre sus estructuras por lo que cada uno puede unirse de forma diferente al receptor a la forma que lo hacen los agonistas. Se ha propuesto que la manera de unirse de los antagonistas al receptor sea muy similar al observado en los receptores de naturaleza peptídica, como el de angiotensina II (Feng et al., 1995), el de endotelina (Adachi et al., 1992) o el de neuroquina (Fong et al., 1993), los cuales tienen una región crítica para la unión localizada en las asas extracelulares o en la superficie extracelular del receptor. Sin embargo, se ha visto que algunos de los antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos se unen al receptor en las asas extracelulares o cerca de la superficie del receptor y no por el sitio formado por los dominios transmembranales del receptor, lugar donde se sabe que se unen los agonistas (Ming-Ming et al., 1996).

A continuación se muestran los esquemas de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

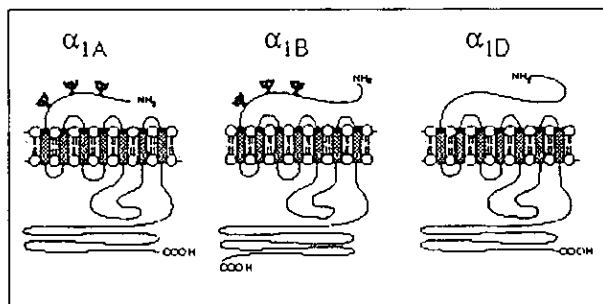


Fig. 5 Estructura esquematizada de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.

Ψ indica los sitios de glucosilación.

Tomado de Goodman & Gilman's., 1996. pag. 201.

Los análisis de Northern no mostraban RNAm del  $\alpha_{1c}$ -adrenérgico en ninguno de los tejidos de rata de los analizados, corazón, pulmón, hígado, cerebro, riñón y bazo.

Al hibridar en otras especies, se detectaba el subtipo  $\alpha_{1c}$  en hígado de conejo y en hipocampo de humano (Schwinn et al., 1991).

Estudios fisiológicos en hepatocitos y ensayos con ligandos marcados radiactivamente en membranas de hígado de conejo, llevados a cabo en laboratorio, mostraron efectivamente la existencia de un subtipo diferente de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, cuyo perfil farmacológico era el esperado para el  $\alpha_{1c}$ -adrenérgico (García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz et al., 1995a; García-Sáinz et al., 1995b). Los estudios de asociación de ligando radiactivo realizados por otro grupo, confirmaron nuestros resultados (Taddei et al., 1993).

Otros estudios indican que existe una considerable variación en los subtipos de receptores expresados en el hígado de diferentes animales. Por ejemplo en ratas (Han et al; 1987; García-Sáinz et al; 1992b; García-Sáinz et al 1994; García-Sáinz et al 1995e), hámsters (García-Sáinz et al, 1994), ratón (García-Sáinz et al; 1994), pollos (Gutiérrez Venegas y García-Sáinz, 1993), y peces (*Ictalurus punctatus*) (García-Sáinz et al; 1995b) expresan el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico mientras los cuyos (García-Sáinz et al 1992a; García-Sáinz et al; 1992b), los conejos (García-Sáinz et al; 1993a), los perros (García-Sáinz et al, 1995c), expresan predominantemente el subtipo  $\alpha_{1A}$  lo que pone de manifiesto la existencia de heterogeneidad de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos entre los hígados de diferentes especies.

En la tabla 3 se resumen algunas de las características de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, así como la nomenclatura actual de acuerdo a la última reunión de la International Union of Pharmacology. En 1995 se determinó que las características de este receptor  $\alpha_{1c}$  eran idénticas a las del  $\alpha_{1A}$  clonado, por lo que se clasificó como  $\alpha_{1A}$  dado que la mayor parte de la evidencia experimental sugiere fuertemente una misma identidad entre el subtipo  $\alpha_{1c}$  y  $\alpha_{1A}$  por lo que en la reunión se determinó discontinuar el uso del  $\alpha_{1c}$ -adrenérgico en la nomenclatura y por consenso designar (al anteriormente llamado  $\alpha_{1c}$ ) al receptor nativo  $\alpha_{1A}$ - y para el recombinante  $\alpha_{1c}$ -adrenérgico.



Además se implementó el uso de letras mayúsculas y minúsculas en los subíndices para distinguir entre el receptor nativo y el recombinante (Hieble et al., 1995).

También se aceptó la designación del  $\alpha_{1D}$ - para el receptor nativo y para el clonado  $\alpha_{1d}$ - que presenta un perfil farmacológico como el receptor recombinante previamente designado como  $\alpha_{1ad}$ -adrenérgico.

Tabla 3. Características de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos clonados.

Características	Subtipo de receptor		
	$\alpha_{1A}$ ( $\alpha_{1AC}$ )	$\alpha_{1B}$	$\alpha_{1D}$
Peso molecular aparente	...	80	≈65
No. de aminoácidos	466	515	561
Sitios de glicosilación	3	4	2
Sitios de fosforilación	PKA	PKA	...
Organización genómica			
intrones	1	1	1
exones	2	2	2
Selectividad farmacológica			
agentes selectivos para los subtipos	5-metilurapidil, (+)niguldipina, oximetazolina, A-61603, SNAP-5089	AH11110A,	(+)norepinefrina, BMY7378, SKF105854
agentes no selectivos	...	Prazosina, Fentolamina, abanoquil, terazosina, doxazosina, tamsulosina	...
Susceptibilidad a la modificación covalente			
cloroetilclonidina	+	+++	++
SZL-49	+++	+	-
azidoprazosina	ND	+++	-
Tejidos prototipo			
	Riñón de rata, y glándula submaxilar, hígado de conejo, hígado y corazón humano,	Bazo, hígado y corazón de rata, hígado de hámster	aorta, pulmón y corteza cerebral de rata
Señal de transducción acoplada al receptor			
	PLC	Movilización $Ca^{2+}$ , PLC, $PLA_2$ , PLD	...
Proteína G acoplada			
	$G_{\alpha 11/14}$	$G_{\alpha 11/14/16}$ , $G_n$	$G_{\alpha 1}$

Tomado de Graham R et al., (1996). Circulation Research 78:5:739.

Como se ha descrito a lo largo de esta introducción, existe una considerable variación en los subtipos de receptores que se expresan en los tejidos de diferentes especies. De esta forma en el hígado de diferentes especies (ratas, hámsters, ratones, peces) el principal receptor es del subtipo  $\alpha_{1B}$  (García-Sáinz et al., 1994; García-Sáinz et al., 1995e), mientras que en el hígado de conejos, cueros y perros, los receptores expresados pertenecen al subtipo  $\alpha_{1A}$  (García-Sáinz et al., 1995c; García-Sáinz et al., 1995e), por lo que la extrapolación de datos a una u otra especie no resulta apropiada en la gran mayoría de los estudios que se realizan sobre el modo de acción de diferentes compuestos encaminados hacia el uso de la terapéutica.

La finalidad de realizar modelos experimentales es extrapolar sus resultados hacia el organismo humano, pero en este caso, se corre el riesgo de tener efectos secundarios no deseables. De aquí la importancia de conocer específicamente el subtipo de receptor presente en el hígado de humano y en un animal que por sus características evolutivas pareciera ser más cercano al humano (*homo sapiens*) como es el mono rhesus (*Macaca mulata*), lo que desde el punto de vista experimental es interesante. Estos dos modelos resultan sumamente atractivos ya que la distribución y el subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en los tejidos humanos representa una gran ayuda para las implicaciones de tipo fisiológico y terapéutico. El potencial que representa el empleo de compuestos cada vez más selectivos para cada tipo de receptor resulta de gran relevancia a nivel fisiológico, ya que una gran cantidad de tejidos humanos expresan muchos de los receptores adrenérgicos los cuales pueden mediar una gran cantidad de respuestas fisiológicas (tabla 4).

En base a la información anterior se pretende realizar la caracterización del subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico presente en las membranas de hígado de humano y de mono rhesus, además de confirmar su presencia mediante ensayos de biología molecular.

**Tabla 4.** Efectos de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos sobre órganos humanos.

Órganos Efectores	Respuesta
-------------------	-----------

Ojos	
Músculo radial	Contracción (midriasis)
Arterias	
Coronarias	contracción
piel y mucosa	contracción +++
músculo esquelético	contracción ++ dilatación
Cerebrales	contracción insignificante
Pulmonares	contracción dilatación
Víceras abdominales	contracción +++ dilatación
Glándulas salivares	contracción + ++
Renales	contracción +++ dilatación
Pulmón	
Glándulas pulmonares	disminución de la secreción
Estómago	
Motilidad y tono	disminución (normalmente)
Intestino	
Motilidad y tono	disminución
Esfínteres	contracción (normalmente)
Riñón	
Secreción de renina	disminución
Vejiga	
Trigone y esfínteres	contracción ++
Uretra	
Motilidad y tono	aumento
Útero	durante el embarazo: contracción
Órganos sexuales masculinos	eyaculación ++
Piel	
músculos del piloro	contracción ++
glándulas sudoríferas	secreción localizada
Hígado	glucogenólisis y gluconeogénesis
Glándulas salivales	secreción de K <sup>+</sup> y agua

Tomado de Goodman & Gilman's.,1996. 110.

## OBJETIVOS

### General

Lograr la caracterización farmacológica de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en el hígado de humano y de mono rhesus.

### Particulares

- 1.- Clasificar el subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ) que se encuentra expresado en cada uno de los dos modelos empleados.
- 2.- Determinar las condiciones experimentales óptimas de: concentración de membranas, temperatura y tiempo de incubación, para los estudios de saturación con el ligando tritiado prazosina.
- 3.- Determinar la sensibilidad al agente alquilante cloroetilclonidina (CEC).
- 4.- Realizar los estudios de competencia con el ligando marcado radiactivamente ( $[^3H]$  prazosina). Empleando diferentes agonistas (norepinefrina, epinefrina, metoxamina, oximetaxolina). Y antagonistas (prazosina, WB4101, benoxathian, fentolamina, 5-metilurapidil, (+) nifedipina, tamsulosina y BMY7378), que son compuestos selectivos para la clasificación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos.
- 5.- Determinar si estos receptores median su efecto a través de una proteína G; para ello se empleará un análogo no hidrolizable Gpp(NH)p, en los ensayos donde se use el ligando natural epinefrina.
- 6.- Montar las condiciones experimentales para la obtención de RNA de hígado mono rhesus.
- 7.- Obtener las condiciones experimentales para la amplificación por PCR empleando oligonucleótidos específicos.
- 8.- Caracterizar los fragmentos generados por PCR y emplear sondas específicas para cada uno de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (análisis de Northern blot).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

(-)-Epinefrina, (-)-norepinefrina, oximetazolina, prazosina, Gpp(NH)p, Tris-base, sacarosa fueron obtenidos de Sigma Chemical. Benoxathian, 5-metil-urapidil, cloroetilclonidina (CEC), BMY 7378 y WB4101 fueron de Research Biochemicals. Los siguientes compuestos fueron proporcionados por las compañías indicadas. Fentolamina (Ciba Geigy), metoxamina (Burroughs Wellcome), (+)-niguldipina (Byk Gulden), Tamsulosina (Yamanouchi Europe). [<sup>3</sup>H]prazosina (71.8 Ci/mmol) fue obtenida de New England Nucler. El [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (6000 Ci/mmol) y un "kit" de Nick Translation fueron adquiridos de Amersham. Las enzimas de restricción fueron de New England BioLabs. NaHCO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, cloroformo, alcohol isoamílico, etanol de la compañía Baker.

### Material biológico

El estudio con los hígados humanos fue aprobado por el comité científico del Instituto de Cardiología Ignacio Chávez. Las muestras de hígado de humano (*Homo sapiens*) fueron obtenidas a partir de las autopsias de cuatro pacientes, las cuales se realizaron después  $\approx$ 2 h del fallecimiento del paciente. La mayor parte de los pacientes fueron hombres con un promedio de edad  $\approx$ 54 años y la causa de muerte fue de infarto al miocardio, solo una mujer de 35 años quien murió de embolia pulmonar. La toma de muestras de hígado y el diagnóstico de los pacientes fue realizada por el Dr. Alberto Aranda. Las muestras de hígado una vez obtenidas se guardaron inmediatamente a -70°C en un untracongelador Revco hasta su posterior procesamiento por separado.

Las muestras de hígado de mono rhesus (*Macaca mulata*) fueron proporcionadas generosamente por el Dr. Ranulfo Romo quien empleó los animales para estudios de electrofisiología (Ruiz et al., 1995). Los cuatro animales empleados tenían las siguientes características: (1) una hembra de 6.5 kg de peso,  $\approx$  4.5 años de edad, (2)

un macho de 5.5 kg. de peso,  $\approx$  3.0 de edad, (3) un macho de 18 kg., de  $\approx$  6.5 de edad y (4) otro macho de 3.5 kg., de  $\approx$  3 años de edad. Los animales mantenidos y sacrificados siguiendo las normas de nuestra institución y las del NIH. Con la finalidad de evitar al máximo el sufrimiento innecesario, los animales se sometieron a anestesia general e inmediatamente después fueron sacrificados.

Las muestras de hígado de los animales, fueron empleadas para la obtención de membranas de cada animal por separado.

### **Procedimiento general de obtención de membranas.**

1.- La muestra de hígado se cortó en pequeños trozos, estos se homogeneizaron en una solución fría de  $\text{NaHCO}_3$  1 mM, en una proporción de 1g de tejido por 4.5 ml de  $\text{NaHCO}_3$  en un homogenizador de vidrio Dounce. Todo el procedimiento se realizó a 4 °C.

2.- El homogenado de hígado se filtró a través de 4 capas de tela de gasa .

3.- El filtrado se centrifugó a una velocidad de 8860 x g durante 15 min en un rotor SS 34 de una centrifuga Sorvall a 4 °C.

4.- Se desechó el sobrenadante decantando con cuidado. La pastilla obtenida se homogeneizó con una solución de sacarosa al 69 % (p:p) y se ajustó este homogenado a 44 % (p:v) de sacarosa en un refractómetro.

5.- El homogenado llevado a 44 % de sacarosa, se repartió en tubos para ultracentrifuga de 30 ml, poniendo  $\approx$ 15 ml de la solución, después se les adicionaron 10 ml de una solución de sacarosa al 42.3 % (p:v) añadiéndola con sumo cuidado para hacer un gradiente discontinuo de sacarosa.

6.- Se centrifugaron los tubos del paso anterior a 25000 rpm durante 150 min en un rotor de columpio SW 28 de una ultracentrifuga Beckman, a 4 °C.

7.- Al finalizar el tiempo de centrifugación se recuperaron las membranas, que se encontraban en la parte superior de los tubos, formando una especie de botón, el que se recuperó con la ayuda de una espátula.

8.- Las membranas fueron resuspendidas en un homogenizador de vidrio con 50 ml de solución amortiguadora de Tris, 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM, pH 7.5, fría ( $Tris-MgCl_2$ ).

9.- Se centrifugó nuevamente a 20454 x g en un rotor SS 34 de una centrifuga Sorvall durante 15 min a 4 °C.

10.- Se repitieron los dos pasos anteriores con la finalidad de retirar la sacarosa del medio.

11.- Una vez lavadas las membranas se resuspendieron en un volumen final de 10 a 15 ml de solución amortiguadora de  $Tris-MgCl_2$ , se separó una alícuota pequeña de 300  $\mu$ l para la determinación de proteínas, las membranas restantes se alícuotaron y guardaron en congelación en nitrógeno líquido, hasta su empleo.

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Lowry et al.(1951), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

### **Estudios de unión al ligando marcado radiactivamente "binding"**

a) Las membranas (100- 150  $\mu$ g de proteína) fueron incubadas en tubos de plástico, en una solución amortiguadora de Tris, 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM, pH 7.5, con el ligando marcado ( $[^3H]$ prazosina) solo o en presencia de los diferentes agentes, a las concentraciones indicadas en las figuras de resultados (ver figuras de los artículos I y II).

b) La incubación se realizó durante 45 min para las membranas de humano y de 60 min para las de mono rhesus en un baño de agua a 25 °C con agitación constante. En un volumen final de 0.25 ml.

c) La reacción se paró al adicionar solución amortiguadora de  $Tris-MgCl_2$  fría a la suspensión de membranas, e inmediatamente fueron filtraron sobre filtros GF/C empleando un aparato de filtración Brandel y lavados 3 veces con 5 ml de la misma solución.

d) Los filtros secos se transfirieron a viales de vidrio, a los que se les añadió líquido de centelleo y se cuantificó el ligando marcado incorporado en las membranas, como desintegraciones por minuto (dpm).

e) Los ensayos de saturación fueron realizados utilizando un rango de 6 nM a 50 pM de [<sup>3</sup>H]prazosina para las membranas de hígado humano y para las de hígado de mono rhesus el rango fue de 0.05-12 nM.

f) Los experimentos de competencia por el ligando marcado se realizaron con una concentración de ligando marcado radioactivamente de 1 nM y 1-1.5 nM para las membranas de hígado de humano y de mono rhesus respectivamente, dentro de este rango de concentración se tiene una ocupación de 65-85 % de los receptores.

g) La unión no específica del ligando fue evaluada en presencia de Fentolamina 10 μM.

h) Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **Tratamiento con cloroetilclonidina**

Membranas de hígado humano (*Homo sapiens*).

1) El tratamiento de las membranas de hígado humano con cloroetilclonidina (CEC antagonista irreversible), se realizó de la forma siguiente: las membranas se preincubaron 15 min con 100 μM de (CEC) a 25 °C, en un baño de agua con agitación constante.

2) Después del tratamiento, las membranas se diluyeron con la solución amortiguadora de Tris-MgCl<sub>2</sub> fría, se homogeneizaron y se centrifugaron a 20454 x g durante 15 min. Se repitieron estos pasos de resuspensión-centrifugación. Por último, se llevó a un volumen final igual al original de las membranas.

3) Se determinó el contenido de proteínas por el método de Lowry.

4) Posteriormente se realizaron los ensayos de saturación con el ligando marcado [<sup>3</sup>H]prazosina. Usando fentolamina 10 μM para determinar el pegado no específico.



Membranas de hígado de mono rhesus (*Macaca mulatta*)

i) Para las membranas de hígado de mono rhesus el tratamiento con CEC se llevó a cabo de la forma siguiente: las membranas fueron preincubadas con diferentes concentraciones del antagonista irreversible (CEC), en las mismas condiciones de incubación y proceso de lavado que las membranas de hígado humano. Los estudios de asociación al ligando marcado se realizaron con una concentración fija del compuesto marcado que ocupa  $\approx 80\%$  de los sitios de unión.

ii) Los datos obtenidos de los ensayos de saturación y de competencia fueron analizados empleando los programas EBDA y LIGAND (Munson y Rodbard, 1980). El ajuste de las líneas que mostraron dos estados de afinidad se analizó de acuerdo a un modelo más complejo y los valores de  $K_i$  fueron calculados de acuerdo a Cheng y Prusoff (1973).

### **Extracción de RNA**

El aislamiento de RNA de hígado de mono rhesus fue realizado siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (1987) con algunas modificaciones menores.

Se tomó 1 g de la muestra hígado, se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio en 15 ml del reactivo TRI-Reagent. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente se adicionaron 3 ml de una mezcla cloroformo-álcohol isoamílico (49:1), y la mezcla se agitó vigorosamente en el vortex. La mezcla se centrifugó a  $20454 \times g$  durante 15 min. Se tomó la fase acuosa con cuidado, midiendo el volumen, para agregar un volumen igual de isopropanol frío. La muestra se dejó en hielo durante 30 min. Después de este tiempo se centrifugó  $20454 \times g$  durante 15 min. La pastilla obtenida se lavó dos veces con etanol al 70 % frío. La muestra se secó al vacío en un aparato Savantt y se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua previamente tratada con dietilpírocarbonato (DEPC). El RNA total fue cuantificado por espectrofotometría 260/280 nm y se verificó la integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %. El gel se tiñó con bromuro de etidio.

### Procedimiento de RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) se llevó a cabo con el RNA total del hígado de mono rhesus, empleando un "kit" de Perkin Elmer.

Los oligonucleótidos utilizados como "primers" tienen las siguientes secuencias: 5'-CATCGTGGTCCGGCTGCTTCGTCCTCTGCTG-3' oligonucleótido sentido, y 5'-TCCCACGGGGATGCGCACCATGTCCTTGTG-3' oligonucleótido antisentido, estas secuencias corresponden a las bases 1261-1290 y 1547-1576 del cDNA del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico de humano (Hirasawa et al., 1993). Se tomaron 5  $\mu$ g de RNA total y en un eppendorf de 500  $\mu$ l, se añadió  $MgCl_2$  a una concentración final de 5 mmol/L, solución amortiguadora 10X para PCR II (concentración final 1X), 8  $\mu$ l de una mezcla de nucleótidos (1 mmol/L final c/u) y 1  $\mu$ l del oligonucleótido con 2.5 U/ $\mu$ l de la enzima MuLV Reverse Transcriptase antisentido la amplificación por medio del PCR consistió en la desnaturalización a 94°C por 1 min, la alineación del "primer" a 55°C por 30 s y la extensión a 72°C por 1 min (40 ciclos).

Los "primers" 5'-GCTCCTTCTACATCCCGCTCG-3' oligonucleótidos sentido y 5'-AGAACACCACCTTGAACACGG-3' oligonucleótidos antisentido que corresponden a la secuencia de bases 629-649 y 983-1003 del cDNA del receptor de rata  $\alpha_1$ -adrenérgico (Voigt et al., 1990). Se tomaron 5  $\mu$ g de RNA total en un eppendorf de 500  $\mu$ l, se adicionó  $MgCl_2$  para una concentración final de 5mmol/L, amortiguador 10X para PCR II (concentración final de 1X), 8  $\mu$ l de la mezcla de nucleótidos (1mmol/L) final c/u) y 1  $\mu$ l del oligonucleótido antisentido con 2.5 U/ $\mu$ l de la enzima MuLV Reverse Transcriptase en un termociclador en las siguientes condiciones para la reacción de PCR: desnaturalización 94°C por 1 min., la alineación del "primer" a 58.5°C por 60 s y la extensión a 72°C por 1 min. (40 ciclos). Las mezclas para la reacción de RT-PCR fueron calentadas antes de iniciar la reacción a 95°C durante 3 min. y al final de los ciclos se incubó a 72°C por 7 min.

Los productos de PCR fueron sujetos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 %, posteriormente se transfirió a membranas de nylon y se realizó una

hibridación bajo condiciones de alta astringencia, utilizando como sondas marcadas: el cDNA total del receptor de bovino  $\alpha_{1a}$ -adrenérgico (Schwinn et al., 1990), o el cDNA total del receptor hámster (DDT<sub>1</sub>MF-2)  $\alpha_{1b}$ -adrenérgico (Cotecchia et al., 1988). El marcaje se realizó por "Nick Translation" con una actividad específica de  $\approx 10^8$  cpm/ $\mu$ g.

### Ensayos de hibridación

Las sondas empleadas fueron marcadas con 10  $\mu$ Ci de CTP ( $\alpha^{32}$ P), con el kit de "Nick-Translation" de Amersham. Todas las sondas se emplearon con una actividad específica mínima de  $1.4 \times 10^6$  cpm/ $\mu$ l de DNA. Para verificar la cantidad de cuentas incorporadas se empleó el método de precipitación con TCA en un contador de centelleo.

### "Northern blot"

El análisis de "Northern blot" (Maniatis et al., 1989), se realizó por electrofóresis horizontal en un gel de agarosa al 1.5 % desnaturalizante (con formaldehído al 17 %), 20  $\mu$ g de RNA total por carril. Como amortiguador de corrida se utilizó MENP (4.18 g de MOPS, 0.68 g de acetato de sodio, 0.37 g de EDTA y 20 ml de una solución de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> 1 mol/L a pH 6.9). Para aplicar al gel cada una de las muestras: éstas se mezclaron con 5  $\mu$ l de una solución de muestras (400  $\mu$ l de formamida desionizada, 120  $\mu$ l de formaldehído al 37 % y 90  $\mu$ l de MENP 10X), se calentaron durante 10 min. a 65°C. Después se les adicionaron 5  $\mu$ l de colorante para RNA (50 % glicerol, 1 mM de EDTA, 10 mM de fosfatos de Na y K pH 6.9 y 0.05 % de azul de bromofenol) y se cargaron en el gel. La electroforesis se corrió a 1mA/cm<sup>2</sup> en el cuarto frío, durante tres horas.

Los geles fueron transferidos por capilaridad a una membrana de Nylon (Amersham) y el RNA se fijó a la membrana por entrecruzamiento con luz UV con ciclos de 0.125 J/cm<sup>2</sup> (3-4 ciclos)

### Condiciones de hibridación

Las membranas de Nylon se prehibridaron durante 4 horas a 55 °C en una solución preparada con formamida desionizada al 35%, 10% de dextran sulfato . SSPE 5X, solución Denhardt 5X , 1% SDS y 5 mg/ml de DNA inespecifico (DNA de esperma de salmón) en una bolsa de polietileno sellada. Después de este tiempo, se le adicionaron 200 µl de la sonda específica marcada con dCTP ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P ). Se dejaron hibridando durante 16 h a 55 °C.

A los filtros se les retiró la mezcla anterior y se lavaron dos veces con una solución de SSC 0.2% (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7.4) y 0.2% de SDS durante 15 min. a 55 °C cada vez, dos veces con SSC 0.1% y SDS 0.1% por 15 min. a 55 °C y finalmente con SSC 0.1X durante 15 min a temperatura ambiente. Se secó durante 30 min a temperatura ambiente sobre toallas de papel.

### Autorradiografía

Se utilizaron placas para autorradiografía (Kodak X omat) que se expusieron en presencia del filtro de 7 a 10 días. Los cassettes se guardaron a -70°C. Las placas se revelaron con los reactivos indicados por el fabricante.

### "Southern blot"

Preparación de las membranas.

Se realizó una electroforesis con los productos de PCR. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5 % o en acrilamida al 7.5% en TBE. Después de la corrida de los geles se trataron con 100 ml de una solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M y NaCl 1M ), agitándose con suavidad durante 15 min y dos veces durante igual tiempo con solución neutralizante (NaCl 1.5 M y Tris 1 M pH 7.5).

Los geles así tratados fueron transferidos por capilaridad a una membrana de Nylon (Maniatis et al., 1989).

Las condiciones de hibridación y lavado fueron de alta astringencia, con la misma técnica empleada para el "Northern blot". Las placas se expusieron 24 h a -70°C .

## RESULTADOS

Los resultados de la caracterización y clasificación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos detectados en el hígado de humano (*Homo sapiens*) y de mono rhesus (*Macaca mulatta*) se encuentran en los siguientes trabajos:

### Artículo I

1) "Characterization of the human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors: predominance of the  $\alpha_{1A}$ -subtype." Autores: J. Adolfo García-Sáinz, Ma. Teresa Romero-Avila, Ma. Eugenia Tórres-Márquez. Publicado en European Journal of Pharmacology (1995) 289, 81-86

### Artículo II

2) "Coexpression of  $\alpha_{1A}$  - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Autores: J. Adolfo García-Sáinz, Ma. Teresa Romero-Avila, Claudia González-Espinosa. Publicado en European Journal of Pharmacology (1996) 311; 277-283.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con las membranas de hígado de humano (*Homo sapiens*) y de hígado de mono rhesus (*Macaca mulata*) en la caracterización farmacológica, realizada por la técnica de asociación de un radioligando marcado radioactivamente, "binding", indican claramente la presencia de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Para la población de receptores encontrados en las membranas de hígado humano la utilización de agonistas y antagonistas selectivos muestran que estos pertenecen al subtipo de receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico. En cambio, al emplear estos compuestos con las membranas de hígado de mono se encuentra consistentemente la existencia de dos poblaciones de receptores adrenérgicos, lo que se confirmó con los resultados obtenidos por biología molecular, donde claramente se detecta la existencia de dos subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, que se coexpresan en el hígado de *Macaca mulata*, el  $\alpha_{1A}$  - y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos (Fig. 5 artículo II).

La metodología de unión a un ligando marcado radiactivamente, "binding", nos permitió clasificar a los receptores de acuerdo a su perfil farmacológico, además de conocer el nivel de los receptores expresados en las membranas de hígado. En trabajos anteriores ha sido posible determinar la cantidad de receptores en las membranas de hígado de otras especies, y se ha visto que el nivel de sitios que se han detectado varía ampliamente. De esta forma hemos observado que en membranas de rata, ratón y hámster el nivel de receptores detectado se encuentra entre 500-900 fmol/mg de proteína de membrana (García-Sáinz et al., 1994). Estos modelos animales se podrían catalogar como especies con alta densidad de receptores, en cambio en otras especies el número de receptores presentes es mucho más bajo como es el caso del pez y del cuyo, en donde la cantidad de receptores es de 30 y 36 fmol/mg de proteína de membrana (García-Sáinz et al., 1995a; García-Sáinz et al., 1993b), por lo que se consideran como especies con baja densidad de receptores. En cambio las especies cuyo número de receptores en hígado es intermedio (humanos con un rango de 50-80 fmol/mg de proteína de membrana (Fig 2. artículo I) y mono rhesus con 97 fmol/mg de proteína de membrana (Fig. I artículo II), por lo

se podrían clasificar como especies con receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos moderadamente abundantes.

Estos datos no son sorprendentes ya que anteriormente se tenía conocimiento de la existencia de heterogeneidad dentro de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1995).

El empleo de antagonistas, cada vez más selectivos, para diferenciar entre los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos como ha sido de gran utilidad dentro de los cuales se han reportado: la tamsulosina (Michel et al., 1994; García-Sáinz et al., 1995b), la (+) niguldipina (Boer et al., 1988; Han et al., 1991), el WB4101 (Morrow et al., 1986), el 5-metil-urapidil (Gross et al., 1988), y el benoxathian (Michel et al., 1989), los cuales han demostrado tener una mayor afinidad por el subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico, mientras que la prazosina es considerada como un antagonista no selectivo para los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Bylund et al., 1994).

Se ha reportado que la cloroetilclonidina (CEC) es un compuesto que se une de manera irreversible a la población de receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos, inactivándolos (Minneman et al., 1988; Han et al., 1987), mientras que no inactiva a los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos. Este compuesto ha sido de gran utilidad para distinguir entre estas dos poblaciones de receptores. El pretratamiento de las membranas de hígado humano y de mono rhesus con CEC muestra que fueron sensibles a este tratamiento, inactivando una proporción de  $62 \pm 5\%$  de los sitios de unión a [ $^3\text{H}$ ]prazosina en membranas de hígado de humano, sin que se observe un cambio en la afinidad por el ligando (Fig. 3 artículo I). Para las membranas de hígado de mono rhesus se encontró una inactivación de los receptores dependientes de la dosis de CEC, observándose una inactivación de 70 % de los sitios de unión al ligando [ $^3\text{H}$ ]prazosina, a una concentración igual de CEC (100  $\mu\text{M}$ ) que la empleada en las membranas tratadas de hígado humano (Fig. 2 artículo II). Por lo que estos receptores son de mediana sensibilidad por este antagonista, siendo los más sensibles los subtipos  $\alpha_{1B}$  por ejemplo: los encontrados en hígado y bazo de rata (Han y

Minneman., 1991; García-Sáinz et al., 1992), hígado de hamster (García-Sáinz et al., 1994).

El subtipo que le sigue en orden de sensibilidad a la CEC son los receptores  $\alpha_{1D}$ -adrenérgicos localizados en aorta de rata (Michel et al., 1994). Siendo los menos sensibles los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1992a). Por lo que el orden de sensibilidad para la CEC sería el siguiente  $\alpha_{1B} \geq \alpha_{1D} > \alpha_{1A}$ .

Otro aspecto importante es la coexistencia de los subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos en las membranas de hígado de mono rhesus. La presencia de diferentes poblaciones de receptores en un mismo tejido ya se ha reportado en otros tejidos como en la corteza cerebral de rata, hipocampo, riñón y corazón (Michel et al., 1993).

Al comparar los datos con los reportados en la literatura se encuentra la existencia de poblaciones homogéneas de receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos en glándula submaxilar de rata (Michel et al., 1989), en hígado de conejo (García-Sáinz et al. 1992; Taddei et al., 1993), en cuyo (García-Sáinz et al. 1992; García-Sáinz et al. 1993), en próstata de humano (Furray et al., 1994).

Al probar el compuesto BMY 7378 que es considerado como un antagonista selectivo para el subtipo  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico (Goetz et al., 1995; Piascik et al., 1995), en las membranas de hígado de mono se encontró una afinidad muy baja por los receptores de estas membranas, la curva de desplazamiento es monofásica, por lo que se puede inferir que los receptores del subtipo  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico no existen en estas membranas (Fig. 4 artículo II).

En estudios previos realizados con los agonistas oximetazolina y metoxamina, midiendo el recambio de fosfatidilinositol (PI), se observó que metoxamina era un agonista total en la aorta de conejo, mientras que oximetazolina se comportaba como un agonista parcial en la aorta de conejo, a diferencia de los hepatocitos de rata en los cuales los dos agonistas usados no se observaba actividad midiendo el mismo parámetro lo que sugería una diferencia entre los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (García-Sáinz et al., 1985). En trabajos posteriores empleando estos dos agonistas,



se ha demostrado que tienen una afinidad diferente por los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mostrando claras diferencias para cada uno de los subtipos (García-Sáinz et al., 1992; García-Sáinz et al., 1993; Bylund et al., 1994). Esta afinidad relativamente alta por la oximetazolina y metoxamina ha sido observada en las membranas de células que expresan el  $\alpha_{1A}$  clonado (Schwinn et al., 1992).

Tratando de averiguar a que sistema de transducción se encuentra acoplados los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, se midió la actividad de fosforilasa  $\alpha$ , (una medición indirecta de la movilización de calcio), la concentración  $IP_3$  (fosfatidil inositol 1,4,5 trisfosfato) y la liberación de  $Ca^{2+}$ , como parámetros fisiológicos (García-Sáinz et al., 1995c); se encontró que se acoplan principalmente al recambio de fosfoinosítidos-calcio, que son activados por los agonistas naturales epinefrina y norepinefrina, así como, por los compuestos sintéticos oximetazolina y metoxamina. Por lo que el orden de potencia para los sitios de unión en las membranas de humano con agonistas fue:

$$\text{oximetazolina} > \text{epinefrina} \geq \text{norepinefrina} > \text{metoxamina}$$

(Fig. 4 artículo I) y para las membranas de hígado de mono rhesus en cambio, presentó una distribución diferente por lo que el orden de potencia encontrado para los diferentes sitios de unión fue el siguiente:

1) para los sitios de alta afinidad el orden mostrado es:

$$\text{oximetazolina} > \text{epinefrina} = \text{norepinefrina} > \text{metoxamina}$$

2) para los otros sitios (los de baja afinidad por los agonistas selectivos  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos):

$$\text{oximetazolina} \geq \text{epinefrina} = \text{norepinefrina} \gg \text{metoxamina}$$

(Fig. 3 artículo II). Al realizar el análisis de los datos con los diferentes agonistas, se observó de manera consistente que curvas de competencia con los agonistas presentaban una pendiente cuyos valores eran menores que uno, lo que sugiere fuertemente la presencia de diferentes poblaciones de receptores (heterogeneidad) en las membranas de mono rhesus (Tabla 1 artículo II).

Tal heterogeneidad se puede explicar por: a) la coexistencia de varios subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, b) más de un estado de afinidad para los agonistas, dado por los diferentes subtipos de receptores, c) o la conjunción de ambas.

Aunque la sugerencia de múltiples subtipos de receptores fue inicialmente propuesta por las diferencias en los órdenes de potencia encontradas para los antagonistas: prazosina y fenoxibenzamina en ensayos realizados *in vitro* (Coates et al., 1982), ayudando con ello a la clasificación de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, tanto en los estudios fisiológicos y farmacológicos.

De aquí que el orden de potencia mostrado con los antagonistas aquí empleados sea el siguiente en nuestros dos modelos de estudio: en las membranas de humano se tiene el perfil siguiente:

*WB4101*  $\geq$  prazosina  $>$  (+)niguldipina = 5-metil-urapidil  $\geq$  benoxathian  $>$  fentolamina mostrando así que la gran mayoría de los receptores son del subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos (Fig. 6 artículo I).

Se ha demostrado que los antagonistas WB4101, (+) niguldipina y el 5-metil-urapidil muestran una gran afinidad por el subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico (Perez et al., 1991; García-Sáinz et al., 1992; García-Sáinz et al., 1993). Al realizar el análisis con el programa de LIGAND los datos muestran que el valor de la pendiente de las curvas de competencia para los antagonistas se encuentran dentro de un rango de 0.80 a 0.90, estos valores se ajusta al modelo de un solo sitio de unión para los compuestos probados. Cabe mencionar que los sitios de unión tienen afinidades relativamente altas de 1 a 10 nM para todos ellos; si comparamos estos datos con los detectados en el hígado de conejo (García-Sáinz et al., 1992; García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz et al., 1993; Taddei et al., 1993) se encuentran dentro un rango de 10 veces menor que los aquí reportados (las afinidades reportadas para los antagonistas de los receptores clonados se encuentran en el rango 0.013 -0.7 nM).

Para el modelo de mono, los órdenes de potencia fueron los siguientes:

(a) para los sitios de alta afinidad: *tamsulosina*  $\geq$  *WB4101*  $\geq$  *prazosina*  $\geq$  (+)*niguldipina*  $>$  *5-metil-urapidil* = *benoxathian*  $>$  *fentolamina*  $>$  *BMY 7378* (Fig. 4 y Tabla I artículo II)

(b) para los otros sitios (los de baja afinidad por los antagonistas selectivos para los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos): *prazosina*  $>$  *tamsulosina*  $>$  *fentolamina* = *WB4101*  $>$  (+)*niguldipina*  $\geq$  *5-metil-urapidil* = *benoxathian*  $>$  *BMY 7378* (Fig. 4 y Tabla I artículo II).

Las diferencias entre los antagonistas tienen por lo menos de uno a dos ordenes de magnitud en cuanto a la afinidad que presentan por los sitios de unión y son comparables con lo reportado en otros sistemas (ver Tabla IV). Al igual que los valores de  $K_i$  obtenidos para los diferentes compuestos (Tabla 2 introducción), para clasificarlos como  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos respectivamente. Las curvas monofásicas de los ensayos de competencia y la muy baja afinidad mostrada de estos receptores por el *BMY 7378* sugiere de manera clara que el subtipo  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico no se encuentra presente en las membranas de hígado de mono rhesus. Las curvas de competencia en las membranas de *Macaca mulata* muestran claramente dos componentes, lo que nos indica la presencia de dos poblaciones de subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, encontrándose que la población de receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  presentes en estas membranas se encuentran en una relación de 1:1 y que las constantes de afinidad para los sitios de alta y baja afinidad son acordes con lo reportado en trabajos anteriores, para la clasificación farmacológica de los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos.

El empleo de un análogo no hidrolizable del GTP, el *Gpp(NH)p*, en los ensayos con las membranas de hígado humano demostró que los receptores localizados en las membranas, se encuentran acoplados al sistema de transducción mediante una proteína G que ejerce su acción para activar a la fosfolipasa C (Fig. 5 artículo I). Se sabe que la afinidad del agonista se encuentra modulado por la interacción con éstas proteínas. De esta forma los datos indican que para el caso de las membranas de hígado de humano presenta dos estados de afinidad, uno de alta ( $\approx 50$  nM) y otro de

baja ( $\approx 3\mu\text{M}$ ) para el agonista natural epinefrina, pero al desarrollar los experimentos con el análogo se observó que las curvas tienen un desplazamiento hacia la derecha y el análisis de los resultados muestra una sola clase de sitios con una afinidad de  $\approx 3\mu\text{M}$ . A diferencia de las membranas de mono rhesus, en las cuales los experimentos realizados con oximetazolina y metoxamina se ajustaban mejor a una curva bifásica (Fig. 3 artículo II), lo que indicaba la presencia de dos sitios de unión para el ligando, en una relación de  $\approx 50\%$  para los sitios de alta y baja afinidad (Tabla 1 artículo II), aunque para los agonistas naturales epinefrina y norepinefrina la curva de competencia fue consistentemente monofásica, lo que se ajusta a un solo sitio de unión con afinidades de 533 nM y 830 nM respectivamente (Fig. 3 y Tabla 1 artículo II)

Los estudios realizados de "binding" (asociación de un ligando marcado radioactivamente) fueron confirmados por los ensayos de biología molecular.

Mediante el análisis de Northern se intentó detectar la expresión del RNAm del subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico presente en hígado de mono rhesus, pero el nivel de expresión fue aparentemente muy bajo, así como, la señal detectada fue pequeña. Por lo que se empleó la técnica de RT-PCR con la que se logró observar claramente la expresión selectiva de RNAm de ambos subtipos,  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos (Fig. 5 artículo II).

Estos datos muestran claramente que el hígado de mono rhesus coexpresa a los subtipos de receptores  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos. Los receptores  $\alpha_{1A}$  han sido detectados en los hígados de otras especies como por ejemplo: en cuyo (García-Sáinz et al. 1992a, b), en conejo (García-Sáinz et al. 1992a; Taddei et al., 1993), en perro (García-Sáinz et al. 1995c). En cambio en hígados de otras especies, que generalmente son más frecuentemente empleadas como modelos experimentales, encontramos que estas expresan el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico en el hígado por ejemplo: la rata (Han et al., 1987; García-Sáinz et al. 1992a, 1994), el hámster (García-Sáinz et al. 1994), el ratón (García-Sáinz et al. 1994), el pez (García-Sáinz et al. 1995b), y el pollo (Gutiérrez-Venegas et al., 1993). Aunque

estos receptores también han sido detectados en otros tejidos utilizando ensayos de protección con RNAsa o por RT-PCR en rata (Rokosh et al., 1994), o en humano (Bruno et al., 1991; Price et al., 1993).

La detección del receptor no necesariamente indica que tenga función en el órgano, porque se han realizado estudios en los que se detecta el RNAm del receptor, pero las células no responden a los estímulos, esto se puede tratar de explicar como que el receptor expresado no es funcional en la célula (Price et al., 1994).

La respuesta celular funcional es importante, los diferentes reportes que indican que en hígado humano los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos estimulan la activación de la fosforilasa  $\alpha$  a través de la cascada de señales provocada por el sistema de recambio de fosfoinosítidos/  $\text{Ca}^{2+}$  (Keppens et al., 1993). Nosotros encontramos evidencias al realizar estudios en los hepatocitos de otras especies, midiendo: la producción de  $\text{IP}_3$ , el recambio de fosfoinosítidos (PI), así como, la activación de la fosforilasa  $\alpha$ , que demuestran que los receptores  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos, se encuentran acoplados también a éste sistema (García Sáinz et al., 1992a; García Sáinz et al., 1993), por lo que podríamos inferir que los receptores  $\alpha_{1A}$ - en membranas de hígado humano, y  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos en las membranas de hígado de mono rhesus, pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembranales, que se encuentran acoplados al sistema de recambio de fosfoinosítidos/ $\text{Ca}^{2+}$  mediante la acción de una proteína G.

Aunque también se tienen evidencias del acoplamiento a diferentes sistemas de transducción por estos receptores, se propuso que: mientras que los  $\alpha_{1A}$ -adrenérgicos promueven el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  vía canales sensibles a dihidropiridinas, los  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos promueven la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de los reservorios intracelulares promovidos por el  $\text{IP}_3$  (Minneman., 1988).

Con la clonación de los receptores y el estudio en diferentes tipos de células, existen ahora muchas excepciones para tal acoplamiento. Por ejemplo: los  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos en células MDCK-D1 (Sayer et al., 1993) y en la vena cava de rata

se encuentran unidos al influjo de  $Ca^{2+}$  (Klij et al., 1991); en los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos expresados en células COS-1 demostraron que los tres subtipos pueden movilizar el  $Ca^{2+}$  intracelular e incrementar el influjo de  $Ca^{2+}$  operados via canales (Pérez et al., 1993) por lo que se puede resumir que: los tres subtipos pueden acoplarse no solo a la PLC sino también a la  $PLA_2$  y a la PLD y además promover la producción de AMPc, aunque este efecto se produce de manera tardía debido a que enzima adenilato ciclasa es activada por la PKC

Junto con las pruebas fisiológicas y farmacológicas se logró detectar la presencia de RNAs con sondas específicas para los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en los hígados de humano y mono rhesus y se ha visto que no sólo se encuentran en hígado, sino también en otros órganos y tejidos humanos como: corazón, aorta, riñón, hipocampo, pulmón (Faure et al., 1995), músculo liso de próstata (Forray et al., 1994; Faure et al., 1994).

Los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos se encuentran en otros tejidos de otras especies como por ejemplo: la rata que en tejido adiposo expresa el  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (Tórres-Márquez et al., 1992), además, el  $\alpha_{1A}$  en corteza cerebral, hipocampo, vasos deferentes, riñón y corazón de rata (Price et al., 1994; Roskosh et al., 1994).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los estudios realizados en las membranas de hígado humano (*Homo sapiens*) y en las de mono rhesus (*Macaca mulata*), empleando la metodología de "binding" para la caracterización farmacológica del subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico que se encuentra en estos sistemas se concluye lo siguiente:

- a) Las membranas de hígado de humano expresan predominantemente una población homogénea de receptores adrenérgicos del subtipo  $\alpha_{1A}$ .
- b) La población de receptores adrenérgicos que se coexpresan en las membranas de hígado de mono rhesus pertenecen a los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ . Su presencia fue confirmada utilizando la técnica de RT-PCR e hibridación.

Estos estudios son de particular importancia, porque indican que no se puede seguir realizando extrapolaciones con los diferentes sistemas de estudio, dado que cada especie expresa diferentes subtipos de receptores adrenérgicos.

**Artículo I**

- 1) "Characterization of the human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors: predominance of the  $\alpha_{1A}$ -subtype." Autores: J. Adolfo García-Sáinz , **Ma. Teresa Romero-Avila**, Ma. Eugenia Torres-Márquez . Publicado en European Journal of pharmacology, (1995); No. 289, 81-86



Reprinted from

# European Journal of Pharmacology

---

European Journal of Pharmacology  
Molecular Pharmacology Section 289 (1995) 81–86

## Characterization of the human liver $\alpha_1$ -adrenoceptors: predominance of the $\alpha_{1A}$ subtype

J. Adolfo García-Sáinz <sup>a,\*</sup>, Ma. Teresa Romero-Avila <sup>a</sup>, Ma. Eugenia Tórres-Márquez <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-248: 04510, México, D.F., México*

<sup>b</sup> *Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chavez', Juan Badiano 1, México D.F., México*

Received 24 August 1994; revised 21 November 1994; accepted 2 December 1994



# European Journal of Pharmacology

## Molecular Pharmacology Section

The EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY (MOLECULAR PHARMACOLOGY SECTION) publishes manuscripts on the interactions at the molecular level of substances with biological systems.

Manuscripts submitted to the journal are only accepted on the understanding that: (1) they are subject to editorial review; (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal; (3) the recommendations from the declaration of Helsinki and the internationally accepted principles in the care and use of experimental animals have been adhered to.

In addition to full length papers, the journal publishes short communications, rapid communications and commissioned short articles intended to debate recent advances in rapidly developing fields. Acceptability of rapid communications will be decided by the editors of the journal, who will be advised by an external referee. Full length manuscripts and short communications are generally submitted to 2 referees who are chosen for their ability to evaluate the work. Authors may request that certain referees should not be chosen. Members of the editorial board will usually be called upon for advice when there is disagreement among the referees or between referees and authors, or when the editors believe that the manuscript has not received adequate consideration from the referees. In order to reduce mailing cost, manuscripts will not be returned. Only the decision of the editorial office, together with the advice of the referees will be sent to the author(s). Referees will be requested to keep the copy of the manuscript which they have received for evaluation, and to destroy it once they have been notified of the final decision concerning the manuscript. When authors submit a revised manuscript, they should reply to the comments of the referees, indicating which comments have been incorporated and the reasons for disregarding any suggestions considered unacceptable. Revised manuscripts should be returned in duplicate to the editors. A revised manuscript should be received by the editorial office not later than 5 weeks (in case of minor revision) or 10 weeks (in case of extensive revision) after the editorial decision was sent to the author(s); otherwise it will be processed as a new manuscript. Handwritten additions or corrections will not be accepted. Only complete retyping of the pages affected by revision is acceptable.

For further information please refer to the 'General instructions' at the end of this issue, and the 'Notice to authors' published in Vol. 288 No. 1 p. v.

Editors: J. BRUINVELS, Utrecht      W.H. GISPEN, Utrecht      D.H.G. VERSTEEG, Utrecht

### Editorial Board:

K. AKTORIES, Homburg  
D.S. BREDT, San Francisco  
H. BULT, Wilrijk  
F. CATTABENI, Milan  
M.G. DARLINSON, Hamburg  
M. HAMON, Paris  
D. HOYER, Basel  
E.C. HULME, London  
M. LAZDUNSKI, Valbonne  
S.A. LIPTON, Boston  
M.J. LOHSE, Wurzburg  
K.P. MINNEMAN, Atlanta  
F. MORONI, Florence  
S. NAHORSKI, Leicester

D.G. NICHOLLS, Dundee  
J.M. PFEILSCHIFTER, Basel  
J.P. PIN, Montpellier  
R. QUIRION, Verdun  
P.J. ROBINSON, Newcastle  
N. SAITO, Kobe  
A. SCHOUSBOE, Copenhagen  
W. SCHÜTZ, Wien  
P. SKOLNICK, Bethesda  
M. SOKOLOVSKY, Tel Aviv  
M.J. SOLE, Toronto  
J.C. STOOFF, Amsterdam  
V.I. TEICHBERG, Rehovot  
J. WIKBERG, Uppsala

### Consultants:

E.A. BARNARD, London; J. BOCKAERT, Montpellier; I. CREESE, Newark; S.K. FISHER, Ann Arbor; B.B. FREDHOLM, Stockholm; J.A. GARCÍA-SÁINZ, Mexico; P.D. HRDINA, Ottawa; K.H. JAKOBS, Essen; R.J. MILLER, Chicago; M. NIELSEN, Roskilde; M. RAITERI, Genova; P.J. ROBERTS, Southampton; W. SCHLEGEL, Geneva; S.H. SNYDER, Baltimore; W. SOUDJIN, Leiden; J. TRABER, Köln; D.J. TRIGGLE, Buffalo; J. ZAAGSMA, Groningen

## Characterization of the human liver $\alpha_1$ -adrenoceptors: predominance of the $\alpha_{1A}$ subtype

J. Adolfo García-Sáinz <sup>a,\*</sup>, Ma. Teresa Romero-Avila <sup>a</sup>, Ma. Eugenia Tórrres-Márquez <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 70-243, 04510, México, D.F., México

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología 'Ignacio Chávez', Juan Badiano 1, México D.F., México

Received 24 August 1994; revised 21 November 1994; accepted 2 December 1994

### Abstract

The  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype present in human liver membranes was studied using radioligand binding techniques. [<sup>3</sup>H]Prazosin binding was rapid, saturable and reversible. A kinetically derived  $K_d$  of 0.22 nM was obtained. Rosenthal analysis of saturation isotherms indicated a single class of binding sites with a  $K_d$  of 0.47 nM and a  $B_{max}$  of 70 fmol/mg of protein. Membrane preincubation with chloroethylclonidine markedly decreased total binding (62% decrease) without altering the  $K_d$  for the radioligand. Binding competition experiments were performed and the order of potency for agonists was: oxymetazoline > epinephrine  $\geq$  norepinephrine > methoxamine. The binding affinity for epinephrine was modulated by the GTP analogue guanosine-5'- $\beta$ , $\gamma$ -imidotriphosphate. For antagonists the potency order was: WB4101  $\geq$  prazosin  $\geq$  (-)-niguldipine = 5-methylurapidil  $\geq$  benoxathian  $\geq$  phentolamine. The pharmacological profile of the [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites of human liver membranes suggests that  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors predominate (75%-85% of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors) in this tissue.

**Keywords:**  $\alpha_1$ -Adrenoceptor; Liver, human;  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptor

### 1. Introduction

$\alpha_1$ -Adrenoceptors constitute a heterogeneous family of receptors. Initially, the existence of two subtypes, the  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, was suggested on pharmacological basis (Morrow and Creese, 1986; Minneman, 1988). Molecular biological techniques have allowed cloning and expression of three receptors; i.e., the  $\alpha_{1B}$ - (Cotecchia et al., 1988), the  $\alpha_{1C}$  (Schwinn et al., 1990) and the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors (Lomasney et al., 1991; Perez et al., 1991). It has been difficult to establish the relationship between pharmacologically defined (upper case) and cloned (lower case)  $\alpha_1$ -adrenoceptors and the classification is still evolving (Bylund et al., 1994). Current evidence indicates that: (1) the  $\alpha_{1B}$  clone corresponds to the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor, (2) the  $\alpha_{1D}$  clone seems to represent a novel subtype (i.e., the  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor); (3) most current evidence suggests that the  $\alpha_{1C}$  clone may correspond to the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor

(Bylund et al., 1994; Forray et al., 1994; Rokosh et al., 1994).

Interestingly, there is considerable variation in the subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors expressed in liver cells of different species. Thus, livers from rats (Han et al., 1987; García-Sáinz et al., 1992a, García-Sáinz et al., 1994), mice (García-Sáinz et al., 1994), hamsters (García-Sáinz et al., 1994) and chickens (Gutiérrez-Venegas and García-Sáinz, 1993) express  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors whereas rabbit hepatocytes express  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (Schwinn et al., 1991; García-Sáinz et al., 1992a; Taddei et al., 1993). Guinea pig liver express a receptor with the binding properties of the classical  $\alpha_{1A}$ -subtype (García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz and Romero-Avila, 1993); Northern analysis indicated hybridization to the  $\alpha_{1D}$  cDNA probe (García-Sáinz et al., 1992a).

The information available regarding human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors is very limited. There is evidence that in isolated human hepatocytes, catecholamines can induce phosphorylase activation through  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Keppens et al., 1993). The presence of

\* Corresponding author. Tel.: (525) 622-56-12; Fax: (525) 622-56-11.

[<sup>3</sup>H]prazosin binding sites has been detected in membranes from human liver (Kawai et al., 1986). However, to the best of our knowledge no further pharmacological characterization of such binding sites has been reported. We have performed a detailed study of the binding characteristics of the [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites present in human liver membranes. Our results suggest that human liver expresses predominantly  $\alpha_1$ -adrenoceptors of the  $\alpha_{1A}$  subtype (75-85%); some evidence for the presence of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors (15-20%) was also obtained.

## 2. Materials and methods

(-)-Epinephrine, (-)-norepinephrine, oxymetazoline, prazosin, Gpp(NH)p (guanosine-5'- $\beta$ , $\gamma$ -imido)triphosphate) were obtained from Sigma Chemical. Benoxathian, 5-methyl-urapidil, chloroethylclonidine, and WB4101 were from Research Biochemicals. Phentolamine (Ciba-Geigy), methoxamine (Burroughs Wellcome) and (+)-niguldipine (Byk Gulden) were generous gifts from the indicated pharmaceutical companies. [<sup>3</sup>H]Prazosin (71.8 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear.

Liver samples were obtained at autopsy of four patients; the samples were stored at -70°C until use. Autopsies were performed soon after death (<2 h). The study was approved by the ethical/scientific committees of our institutions. The age, sex and major causes of death of the patients were as follows: patient 1: 57 years, male, myocardial infarction; patient 2: 50 years, male, myocardial infarction; patient 3: 35 years, female, pulmonary embolism; patient 4: 57 years, male, myocardial infarction.

Partially purified human liver plasma membranes were obtained by the method of Neville (1968) up to step 11. Membranes were washed and resuspended in 50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5; aliquots of the membrane preparation were frozen and stored under liquid nitrogen until use (usually within two weeks), without any noticeable change in receptor binding. Binding studies were performed by incubating membranes (100  $\mu$ g) in 50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5 with the radioactive ligand, alone or with the indicated agents. Incubations were in a total volume of 0.25 ml for 45 min in a water bath shaker at 25°C. Identical results were obtained using larger incubation volumes (0.5-1 ml). At the end of the incubation, 5 ml of ice-cold buffer were added to the membrane suspension, the membranes were immediately filtered on GF/C filters and washed three times (5 ml each time) with the same buffer. Saturation experiments were performed using concentrations in the range of 50 pM and 6 nM [<sup>3</sup>H]prazosin and binding competition studies with  $\approx$  1 nM of the radioactive ligand (65-75%

receptor occupation). Non-specific binding was evaluated in the presence of 10  $\mu$ M phentolamine; specific binding represented 65-70% of the total binding at the  $K_d$ . Binding data were analyzed using the Kinetic, EBDA and LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) programs (Biosoft-Elsevier). Two state fits were preferred to one-state fits exclusively when a statistically significant (*F* test) improvement in the goodness of the fit was obtained.  $K_i$  values were calculated according to Cheng and Prusoff (1973). Protein was quantified by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

## 3. Results

Binding of [<sup>3</sup>H]prazosin to human liver membranes was rapid, reaching equilibrium within 10-15 min (Fig. 1), and it was reversible (Fig. 1). Analysis of the binding kinetics yielded the following values:  $K_{-1}$  0.036 min<sup>-1</sup>,  $K_{OBS}$  0.199 at a radioligand concentration of 1 nM, which gave a  $K_1$  of  $1.68 \times 10^8$  min<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>. From these values the kinetically derived  $K_d$  of  $0.22 \pm 0.05$  nM was obtained (mean  $\pm$  S.E.M. of 3 determinations). [<sup>3</sup>H]Prazosin binding was saturable with radioligand concentration and Rosenthal (1967) analysis of the binding isotherms resulted in straight lines consistent with the binding of this radioligand to sites with homogenous affinity (Fig. 2). The  $K_d$  obtained in the saturation isotherms (Table 1) was in reasonable agreement with that kinetically derived and within that observed in many other models for this radioligand (Bylund, 1987). In addition the  $K_d$  and  $B_{max}$  obtained (Table 1) were in close agreement to those reported previously for human liver membranes (Kawai et al., 1986). Little variation was observed in the  $K_d$  (0.3-0.6 nM) and  $B_{max}$  (50-80 fmol/mg protein) values obtained with membranes from the 4 different patients.

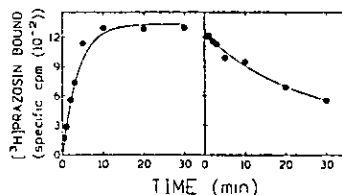


Fig. 1. Kinetics of [<sup>3</sup>H]prazosin binding to human liver membranes. Left panel: membranes were prewarmed for 5 min in the absence or presence of 10  $\mu$ M phentolamine; [<sup>3</sup>H]prazosin ( $\approx$  1 nM) was added and the reaction was stopped by filtration at the times indicated. Right panel: for reversal of binding, membranes were incubated as indicated above for 30 min, 10  $\mu$ M phentolamine was added to the tubes that did not contain this antagonist; at the times indicated the reaction was stopped. Plotted is a representative experiment that was replicated 3 times.

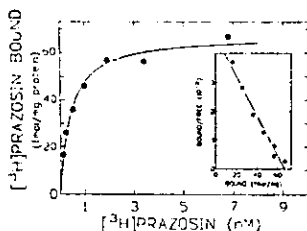


Fig. 2. Binding isotherm and Rosenthal analysis of [<sup>3</sup>H]prazosin binding to human liver membranes. Specific binding and the Rosenthal plot (insert) are presented. Plotted is a representative experiment.

Table 1  
Binding parameters from [<sup>3</sup>H]prazosin saturation experiments with human liver membranes

Treatment	$K_d$ (pM)	$B_{max}$ (fmol/mg protein)
None (4)	0.47 ± 0.06	70 ± 10
Pre-incubated alone (4)	0.42 ± 0.03	60 ± 6
Pre-incubated with 100 μM CEC (4)	0.37 ± 0.02	22 ± 2

Results are the means ± S.E.M. with the number of membrane preparations indicated in parentheses; two independent determinations were performed with each membrane preparation. CEC, chloroethylclonidine.

In order to test the sensitivity of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of human liver membranes to chloroethylclonidine (100 μM), membranes were preincubated with this antagonist for 15 min at 25°C. After this treatment, the membrane preparations were diluted with cold buffer and washed twice by centrifugation-resuspension. Treatment with chloroethylclonidine resulted in a marked decrease (62 ± 5%; mean ± S.E.M.,  $n = 4$ ) in receptor number with no major change in affinity for the radioligand (Fig. 3 and Table 1).

Binding competition with agonists indicated the following order of potency: oxymetazoline > epinephrine ≥ norepinephrine > methoxamine (Table 2 and Fig. 4). The affinities for oxymetazoline and methoxamine were relatively high. The slopes of the agonist binding com-

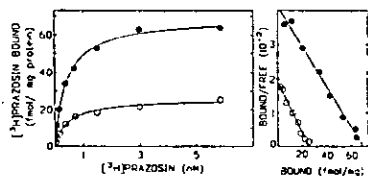


Fig. 3. Binding isotherm and Rosenthal analysis of [<sup>3</sup>H]prazosin binding to human liver membranes preincubated in the absence (filled circles) or presence (open circles) of 100 μM chloroethylclonidine. Specific binding (left panel) and the Rosenthal plot (right panel) are presented. Plotted is a representative experiment.

Table 2

Binding parameters derived from the competition by agonists and antagonists for [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites

Agonists	$K_i$ (nM)	Slope
Oxymetazoline (4)	106 ± 22	0.55 ± 0.07
(-)-Epinephrine (4)	1,416 ± 491	0.72 ± 0.09
(-)-Norepinephrine (4)	3,587 ± 684	0.66 ± 0.08
Methoxamine (4)	37,431 ± 5,592	0.63 ± 0.05
Antagonists		
WB4101 (4)	0.59 ± 0.09	0.83 ± 0.06
Prazosin (4)	1.02 ± 0.21	0.82 ± 0.06
(+)-Niguldipine (4)	4.30 ± 1.00	0.80 ± 0.04
5-methyl-urapidil (4)	5.00 ± 1.30	0.89 ± 0.07
Benoxathin (4)	7.80 ± 1.90	0.88 ± 0.06
Phentolamine (4)	12.50 ± 2.00	0.87 ± 0.09

Results are the means ± S.E.M. with the number of membrane preparations indicated in parentheses; two independent determinations were performed with each membrane preparation

petition curves were consistently less than 1 (Table 2), suggesting the presence of sites with heterogeneous affinities for these agents. Current ideas indicate that the affinity for agonists of adrenoceptors is modulated by their interaction with G-proteins, i.e. through the formation and dissociation of ternary complexes (De Lean et al., 1980; Samama et al., 1993). Therefore, more detailed binding competition experiments, using the natural agonist, epinephrine, were performed in the absence and presence of the hydrolysis-resistant GTP analogue, Gpp(NH)p. Results are presented in Fig. 5 and Table 3. The data indicated that epinephrine competition curves were rather shallow with Hill slopes of 0.5–0.6. LIGAND analysis of these data clearly indicated in all these cases the presence of two kinds of sites, one with high affinity for epinephrine ( $\approx 50$  nM) and another with lower affinity ( $\approx 3$  μM) for this agonist. In the presence of Gpp(NH)p the epinephrine competition curves became steeper with Hill slopes of 0.9–1 and the LIGAND analysis indicated the presence of a single kind of sites with affinity of  $\approx 3$  μM

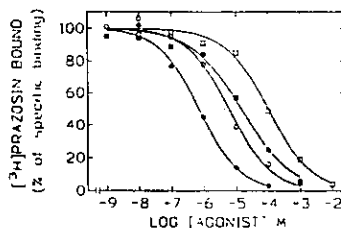


Fig. 4. Competition by agonist for [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites. Membranes were incubated with  $\approx 1$  nM [<sup>3</sup>H]prazosin and varying concentrations of oxymetazoline (filled circles), epinephrine (open circles), norepinephrine (filled squares) or methoxamine (open squares). Plotted is a representative experiment replicated 4 times using different membrane preparations.

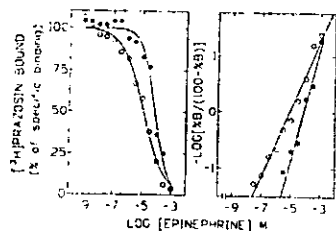


Fig. 5. Effect of Gpp(NH)p of the competition by epinephrine for  $[^3\text{H}]$ prazosin binding sites. Binding competition was performed using  $\approx 1$  nM  $[^3\text{H}]$ prazosin in the absence (open circles) or presence (filled circles) of 100  $\mu\text{M}$  Gpp(NH)p and varying concentrations of epinephrine. Panel A shows the competition for the specific binding and panel B shows the Hill analysis. Plotted is a representative experiment replicated 4 times.

(Table 3). These data indicated that human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors exist in two interconvertible states of affinity for agonists and that such interconversion is modulated by G-proteins, which is consistent with currently accepted models (De Lean et al., 1980; Samama et al., 1993).

Antagonists have been particularly useful to delineate  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes (Morrow and Creese, 1986; Boer et al., 1988; Gross et al., 1988; Michel et al., 1989; Schwinn and Lomasney, 1992). Binding competition studies with antagonists indicated the following potency order: WB4101  $\geq$  prazosin  $>$  (+)-niguldipine = 5-methyl-urapidil  $\geq$  benoxathian  $>$  phentolamine. Representative binding competition curves are presented in Fig. 6 and the  $K_i$  values and competition slopes are presented in Table 2. It is important to emphasize that the binding sites studied have high affinities, i.e., 1 to 10 nM for all the antagonists tested. The slopes of the competition curves were in the range of 0.80–0.90 (Table 2). The possibility that some heterogeneity in the binding sites could exist was considered. LIGAND analysis of the antagonist competition curves indicated that, with the exception of two experiments (same membrane preparation, patient 4), no improvement in the goodness of the fits was obtained with two-state fits as compared to one-state fits. In

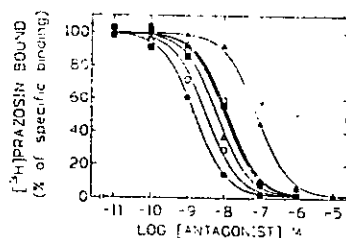


Fig. 6. Competition by antagonist for  $[^3\text{H}]$ prazosin binding sites. Membranes were incubated with  $\approx 1$  nM  $[^3\text{H}]$ prazosin and different concentrations of WB4101 (filled circles), prazosin (open circles), (+)-niguldipine (open triangles), 5-methyl-urapidil (filled squares), benoxathian (open squares) or phentolamine (filled triangles). Plotted is a representative experiment replicated 4 times using different membrane preparations.

those experiments, using 5-methyl-urapidil as a competing ligand the following values were obtained:  $K_H$  1.0 nM,  $K_L$  170 nM,  $R_H$  75%,  $R_L$  25%; with WB4101 the following values were obtained:  $K_H$  0.40 nM,  $K_L$  50 nM,  $R_H$  85%,  $R_L$  15%. We were unable to obtain significant improvements in two-state fits using the other ligands. The data indicate the great majority of the sites (75–85%) present in human liver membranes have high affinity for the antagonists tested; however, they also indicate that a small fraction of the total receptors (15–25%) have lower affinities for these antagonists.

#### 4. Discussion

Our present results clearly indicate the presence of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in membranes from human liver. Antagonists have been particularly useful in the subclassification of these receptors; the high affinity for the tested antagonists strongly suggest that human liver express mainly  $\alpha_1$ -adrenoceptors of the  $\alpha_{1A}$  subtype. Agonists have been less useful for subtype classification; however, relatively high affinity for oxymetazoline and methoxamine has been observed in membranes from cells expressing the  $\alpha_{1C}$  clone (Schwinn and Lomasney, 1992). The  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in membranes from human liver also have high affinities for these agonists which support the idea that these adrenoceptors belong to the  $\alpha_{1A}$  subtype. This is consistent with previous work from two groups (Hirasawa et al., 1993; Price et al., 1994) who have detected  $\alpha_{1C}$  mRNA in samples of human liver. Interestingly, one of these groups (Price et al., 1994) observed using a sensitive RNase protection assay that  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptor mRNA markedly predominates in human liver, but some signal was also detected using the  $\alpha_{1B}$  probe. Evidence indicates that most human tissues express several  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes but that in most tis-

Table 3  
Effect of Gpp(NH)p on the competition by epinephrine for  $[^3\text{H}]$ prazosin binding sites

	Epinephrine	Epinephrine + Gpp(NH)p
Hill coefficient	0.60 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.09
LIGAND analysis		
$K_H$ (nM)	49 $\pm$ 13	–
$K_L$ (nM)	3,272 $\pm$ 560	3,256 $\pm$ 692
$R_H$ (%)	26 $\pm$ 3	–
$R_L$ (%)	73 $\pm$ 3	100

Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 4 determinations using different membrane preparations.

sues one subtype predominates, which may have implications for human physiology and therapeutics (Price et al., 1994).

It should be emphasized that molecular biological techniques, and binding and functional studies are complementary. Detection of an  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype mRNA, although very suggestive, does not necessarily indicate that such receptor is expressed or predominant in a given cell; even less that it mediates an action. Direct detection and quantification of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in given tissue seems to be of major importance. It is worth mentioning that in the human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2, Northern analysis indicated the presence of both  $\alpha_{1d}$ - and  $\alpha_{1b}$ -adrenoceptor mRNA, yet this cell line lacked  $\alpha_1$ -adrenoceptors in ligand binding assays (Kost et al., 1992). Similarly, the presence of  $\alpha_{1d}$  mRNA signal and a classical  $\alpha_{1A}$  pharmacology in guinea pig hepatocytes (García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz and Romero-Avila, 1993) is puzzling and currently being reexamined in our laboratory.

Functional experiments are obviously important. Current evidence indicates that in human liver,  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation stimulates phosphorylase through the phosphoinositide turnover signal transduction process (Keppens et al., 1993). Liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors of different subtypes seem to be coupled to this signal transduction process (García-Sáinz et al., 1992a). Our results suggest, that the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors detected in liver membranes, may mediate the activation of phosphorylase via phosphoinositide turnover, through the activation of a G-protein. However, this remains to be directly determined in isolated human hepatocytes. It should be mentioned that there is evidence that  $\alpha_1$ -adrenoceptors can activate several transduction processes (Minneman, 1988; Cotecchia et al., 1990; García-Sáinz, 1993; Perez et al., 1993) and this seems to depend on the repertoire of G-protein and effectors present in the cells where they are expressed (Perez et al., 1993).

Finally, the liver is a complex organ formed of parenchymal and non-parenchymal cells, and even among parenchymal cells there is some heterogeneity. The membrane purification procedure used in this study predominantly yields membranes from the largely more abundant parenchymal cells (Evans, 1978). However, in the integral function of the organ, non-parenchymal cells play important roles (Altin and Bygrave, 1988; García-Sáinz, 1989; Kuiper et al., 1989). Techniques such as *in situ* hybridization may help to determine if the heterogeneity detected in this study is due to different cell types expressing different receptors or regional heterogeneity among parenchymal hepatocytes.

*In summary*, this study characterizes for the first time the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors present in human liver

membranes. This study further emphasizes the variations observed in the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes expressed in the liver of different species (Han et al., 1987; Schwinn et al., 1991; García-Sáinz et al., 1992a; García-Sáinz et al., 1992b; García-Sáinz and Romero-Avila, 1993; Gutiérrez-Venegas and García-Sáinz, 1993; Hirasawa et al., 1993; Taddei et al., 1993; García-Sáinz et al., 1994; Price et al., 1994).

#### Acknowledgements

This research was partially supported by Grants from CONACyT (4711-N9406), DGAPA (IN 200193) and Fundación Miguel Alemán. The expert secretarial assistance of Ms. Guadalupe Ramírez is gratefully acknowledged. The authors thank Dr. Alberto Aranda for providing us with the human samples and the patient diagnosis.

#### References

- Altin, J.G. and F.L. Bygrave, 1983, Non-parenchymal cells as mediators of physiological responses in liver, *Mol. Cell. Biochem.* 83, 3.
- Boer, R., A. Grassegger, C. Schudt and H. Glossmann, 1988, (+)-Niguldipine binds with very high affinity to  $Ca^{2+}$  channels and to a subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors, *Eur. J. Pharmacol.* 172, 131.
- Bylund, D.B., 1987, Biochemistry and Pharmacology of the alpha-1 adrenergic receptor, in: *The Alpha-1 Adrenergic Receptor*, ed J. Ruffolo RR (Humana Press, Clifton) p. 19.
- Bylund, D.B., D.C. Eikenberg, J.P. Hieble, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, P.B. Molinoff, R.R. Ruffolo, Jr. and U. Trendelenburg, 1994, IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors, *Pharm. Rev.* 46, 121.
- Cheng, Y.-C. and W.H. Prusoff, 1973, Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099.
- Cotecchia, S., B.K. Kobilka, K.W. Daniel, R.D. Nolan, E.Y. Lapetina, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and J.W. Regan, 1990, Multiple second messenger pathways of  $\alpha$ -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells, *J. Biol. Chem.* 265, 63.
- Cotecchia, S., D.A. Schwinn, R.R. Randall, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron and B.K. Kobilka, 1988, Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7159.
- De Lean, A., J.M. Stadel and R.J. Lefkowitz, 1980, A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptor, *J. Biol. Chem.* 255, 7108.
- Evans, W.H., 1978, Preparation of plasma membranes from certain tissues and cell lines. Liver plasma membranes. In *Preparation and Characterization of Mammalian Plasma Membranes* (Elsevier, Amsterdam) p. 177.
- Forray, C., J.A. Bard, J.M. Wetzel, G. Chiu, E. Shapiro, R. Tang, H. Lepor, P.R. Hartig, R.L. Weinschank, T.A. Branchek and C. Gluchowski, 1994, The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor that mediates smooth muscle contraction in human prostate has the pharmacological properties of the cloned human  $\alpha_{1C}$  subtype, *Mol. Pharmacol.* 45, 703.
- García-Sáinz, J.A., 1989, Intracellular communication within the liver has clinical implications, *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 10.

- García-Sáinz, J.A., 1993,  $\alpha_1$ -Adrenergic action: receptor subtypes, signal transduction and regulation, *Cell. Signalling* 5, 539.
- García-Sáinz, J.A. and M.T. Romero-Avila, 1993, Characterization of the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using [ $^3$ H]-methyl-urapidil, *Mol. Pharmacol.* 44, 589.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila, R. Alcántara-Hernández, M. Macías-Silva, J.A. Olivares-Reyes and C. González-Espinosa, 1992a, Species heterogeneity of hepatic  $\alpha_1$ -adrenoceptors:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  subtypes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 760.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila, J.A. Olivares-Reyes and M. Macías-Silva, 1992b, Guinea pig hepatocyte  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation, *Eur. J. Pharmacol.* 227, 239.
- García-Sáinz, J.A., P. Casas-González, M.T. Romero-Avila and C. González-Espinosa, 1994, Characterization of the Hepatic  $\alpha_{1B}$  adrenoceptors of rats, mice and hamsters, *Life Sci.* 54, 1995.
- Gross, G., G. Hanft and C. Rugevics, 1988, 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor, *Eur. J. Pharmacol.* 151, 333.
- Gutiérrez-Venegas, G. and J.A. García-Sáinz, 1993, Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors of chicken hepatocytes, *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 797.
- Han, C., P.W. Abel and K.P. Minneman, 1987, Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors revealed by chloroethylclonidine, *Mol. Pharmacol.* 32, 505.
- Hirasawa, A., K. Horie, T. Tanaka, K. Tagaki, M. Murai, J. Yano and G. Tsujimoto, 1993, Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 902.
- Kawai, Y., A. Powell and I. Arinze, 1986, Adrenergic receptors in human liver plasma membranes: predominance of  $\beta_2$ - and  $\alpha_1$ -receptor subtypes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62, 827.
- Keppens, S., A. Vandekerckhove, H. Moshage, S.H. Yap, R. Aers and H. De Wulf, 1993, Regulation of Glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes, *Hepatology* 17, 610.
- Kost, D.P., M.C. DeFrances, C.R. Lee and G.K. Michalopoulos, 1992, Patterns of alpha-1-adrenergic receptor expression in regenerating and neoplastic hepatic tissue, *Pathobiology* 60, 303.
- Kuiper, J., F.J. Zijlstra, J.A.A.M. Kamps and T.J.C. Van Berkel, 1989, Cellular communication inside the liver. Binding, conversion and metabolic effect of prostaglandin  $D_2$  on parenchymal liver cells, *Biochem. J.* 262, 195.
- Lomasney, J.W., S. Cotecchia, W. Lorenz, W.-Y. Leung, D.A. Schwinn, T.L. Yang-Feng, M. Brownstein, R.J. Lefkowitz and M.G. Caron, 1991, Molecular cloning and expression of the cDNA for the  $\alpha_{1A}$ -adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5, *J. Biol. Chem.* 266, 6365.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Michel, A.D., D.N. Loury and R.L. Whiting, 1989, Identification of a single  $\alpha_1$ -adrenoceptor corresponding to the  $\alpha_{1A}$ -subtype in rat submaxillary gland, *Brit. J. Pharmacol.* 98, 883.
- Minneman, K.P., 1988,  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes. inositol phosphates and sources of cell  $Ca^{2+}$ , *Pharmacol. Rev.* 40, 87.
- Morrow, A.L. and I. Creese, 1986, Characterization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [ $^3$ H]WB4101 and [ $^3$ H]prazosin binding, *Mol. Pharmacol.* 29, 321.
- Munson, P.J. and D. Rodbard, 1980, LIGAND: A versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems, *Anal. Biochem.* 107, 220.
- Neville, J.D.M., 1968, Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540.
- Perez, D.M., M.B. DeYoung and R.M. Graham, 1993, Coupling of the expressed  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cells type specific, *Mol. Pharmacol.* 44, 784.
- Perez, D.M., M.T. Piascik and R.M. Graham, 1991, Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor cDNA, *Mol. Pharmacol.* 40, 876.
- Price, D.T., R.J. Lefkowitz, M.G. Caron, D. Berkowitz and D.A. Schwinn, 1994, Localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human adrenergic physiology, *Mol. Pharmacol.* 45, 171.
- Rokosh, D.G., B.A. Bailey, A.F.R. Stewart, L.R. Karns, C.S. Long and P.C. Simpson, 1994, Distribution of  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 1177.
- Rosenthal, H.E., 1967, Graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system, *Anal. Biochem.* 20, 525.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R.J. Lefkowitz, 1993, A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model, *J. Biol. Chem.* 268, 4625.
- Schwinn, D.A. and J.W. Lomasney, 1992, Pharmacological characterization of cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggests the existence of a fourth subtype, *Eur. J. Pharmacol.* 227, 433.
- Schwinn, D.A., J.W. Lomasney, W. Lorenz, P.J. Szklut, R.T. Frameau, T.L. Yang-Feng, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and S. Cotecchia, 1990, Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel  $\alpha_1$ -adrenergic subtype, *J. Biol. Chem.* 265, 8183.
- Schwinn, D.A., S.O. Page, J.P. Middleton, W. Lorenz, S.B. Liggett, K. Yamamoto, E.G. Lapetina, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and S. Cotecchia, 1991, The  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor: characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity, *Mol. Pharmacol.* 40, 619.
- Taddei, C., E. Poggessi, A. Leonardi and R. Testa, 1993, Affinity of Different  $\alpha_1$ -agonists and antagonists for the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of rabbit and rat liver membranes, *Life Sci.* 53, PL177.



## Artículo II

- 2) " Coexpression of  $\alpha_{1A}$  - and  $\alpha_{1B}$  -adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). Autores: J. Adolfo García-Sáinz , Ma. Teresa Romero-Avila, Claudia González-Espinosa. Publicado en European Journal of pharmacology, (1996) No. 311; 277-283.

Reprinted from

# European Journal of Pharmacology

---

European Journal of Pharmacology 311 (1996) 277–283

Coexpression of  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*)

J. Adolfo García-Sáinz<sup>\*</sup>, M. Teresa Romero-Avila, Claudia González-Espinosa

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, México, D.F. 04510, Mexico*

Received 25 March 1996; revised 23 May 1996; accepted 29 May 1996



## European Journal of Pharmacology

The EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY publishes full length papers, short communications and rapid communications on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems. The journal also considers short reviews (not exceeding 12 pages in print) intended to debate recent advances in rapidly developing fields that are within its scope.

Full length papers and short communications are grouped under the following headings: Behavioral pharmacology, Neuropharmacology and analgesia, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, and Molecular and cellular pharmacology.

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that: (1) they are subject to editorial review, (2) they have not been and will not be published in whole or in part in any other journal, and, (3) the recommendations from the declaration of Helsinki and the internationally accepted principles in the use of experimental animals have been adhered to.

Abridged 'General instructions' for authors are published at the end of each issue. Essential detailed instructions will be found in the 'Notice to authors', published once yearly (for 1996, in Vol. 295, No. 1, page vii).

Founded in 1967. Founding editors: David de Wied and Jacques van Rossum.

Editors: W.H. GISPEN, Utrecht (chairman) J. BRUINVELS, Utrecht F.P. NUKAMP, Utrecht D.H.G. VERSTEEG, Utrecht

Honorary editor: D. DE WIED

### Editorial board:

C. ADVENIER, Paris  
K. AKTORIES, Freiburg im Breisgau  
J. ARNT, Valby  
P.J. BARNES, London  
L. BARTHÓ, Pécs  
G. BIGGIO, Cagliari  
D.S. BREDDT, San Francisco  
O.E. BRODDE, Halle  
H. BULT, Wilrijk  
T.F. BURKS, Houston  
F. CATTABENI, Milan  
L.X. CUBEDDU, Caracas  
M.G. DARLISON, Hamburg  
S. ELLIS, Washington  
M. ENDOH, Yamagata  
J.A. GARCÍA-SÁINZ, Mexico City  
G.F. GEBHART, Iowa City  
M. HAMON, Paris  
D. HOYER, Basel  
E.C. HULME, London  
D.A. KHARKEVICH, Moscow

Z. KLEINROK, Lublin  
G. LAMBRECHT, Frankfurt/VM  
M. LAZDUNSKI, Valbonne  
R. LEFEBVRE, Gent  
X.Y. LI, Shanghai  
S.A. LIPTON, Boston  
M.J. LOHSE, Würzburg  
W. LÖSCHER, Hannover  
J.M. LUNDBERG, Stockholm  
G.S. MARKS, Kingston  
T. MASAKI, Kyoto  
J. McCULLOCH, Glasgow  
D.N. MIDDLEMISS, Harlow  
K.P. MINNEMAN, Atlanta  
H. MÖHLER, Zürich  
F. MORONI, Florence  
E.E. MÜLLER, Milan  
S. NAHORSKI, Leicester  
D.G. NICHOLLS, Dundee  
H.R. OLPE, Basel  
J.M. PEILSCHIFTER, Basel

J.P. PIN, Montpellier  
R. QUIRION, Verdun  
J.A. RIBEIRO, Oeiras  
P.J. ROBINSON, Newcastle  
N. SAITO, Kobe  
A. SARIA, Innsbruck  
P.R. SAXENA, Rotterdam  
A. SCHOUSBOE, Copenhagen  
R. SCHULZ, München  
W. SCHÜTZ, Wien  
P. SKOLNICK, Bethesda  
M. SOKOLOVSKY, Tel Aviv  
J.C. STOCLET, Strasbourg  
J.C. STOFF, Amsterdam  
V.I. TEICHBERG, Rehovot  
P.B.M.W.M. TIMMERMANS, Wilmington  
T. TOMITA, Nagoya  
D.J. TRIGGLE, Buffalo  
B.J.R. WHITTLE, Beckenham  
J. WIKBERG, Uppsala  
R.J. WINQUIST, Ridgefield

### Consultants:

B. AHRÉN, Malmö; E.A. BARNARD, London; E. BEUBLER, Graz; J. BOCKAERT, Montpellier; G. BURNSTOCK, London; R. BUSSE, Frankfurt/VM; S.J. COOPER, Durham; R. COUTURE, Montreal; J.M. CRAWLEY, Bethesda; S.E. DAHLÉN, Stockholm; W. DE JONG, Strasbourg; G. DI CHIARA, Cagliari; H.N. DOODS, Biberach; G.J. DUSTING, Parkville; S.K. FISHER, Ann Arbor; A.W. FORD-HUTCHINSON, Dorval; J.R. FOZARD, Basel; B.B. FREDHOLM, Stockholm; D. GANTEN, Berlin-Buch; J.F. GIUDICELLI, Le Kremlin-Bicêtre; A.R. GREEN, London; R.J. GRYGLEWSKI, Kraków; A. HERMAN, Antwerpen; P. HOLZER, Graz; J.P. HUIDOBRO-TORO, Santiago; S.D. IVERSEN, Oxford; K.H. JAKOBS, Essen; H. KARAKI, Tokyo; S.J. KONTUREK, Kraków; R. LAVERTY, Dunedin; B.E. LEONARD, Galway; B.R. LUCCHESI, Ann Arbor; C.A. MAGGI, Florence; I.G. MARSHALL, Glasgow; M.J. MILLAN, Croissy-sur-Seine; R.J. MILLER, Chicago; A.H. MULDER, Amsterdam; T. NABESHIMA, Nagoya; R.J. NAYLOR, Bradford; M. NIELSEN, Roskilde; D.J. NUTT, Bristol; M. OTSUKA, Tokyo; J.M. PALACIOS, Barcelona; J.R. PARRATT, Glasgow; J.N. PENNEFATHER, Clayton; M. RAITERI, Genova; U. RAVENS, Essen; B.P. ROQUES, Paris; W. SCHLEGEL, Genève; H. SCHOEMAKER, Bagneux; K. SCHRÖR, Düsseldorf; K.F. SEWING, Hannover; P. SNEDDON, Glasgow; S.H. SNYDER, Baltimore; W. SOUDIJN, Leiden; N. SPERELAKIS, Cincinnati; K. STARKE, Freiburg im Breisgau; H.A.J. STRUYKER BOUDIER, Maastricht; J.R. WALTERS, Bethesda; J. ZAAGSMA, Groningen

## Coexpression of $\alpha_{1A}$ - and $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors in the liver of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*)

J. Adolfo García-Sáinz\*, M. Teresa Romero-Avila, Claudia González-Espinosa

Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-248, México, D.F. 04510, México

Received 25 March 1996; revised 23 May 1996; accepted 29 May 1996

### Abstract

The  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in the liver of rhesus monkeys was characterized using [ $^3$ H]prazosin. This radioligand binds to monkey liver membranes with high affinity ( $K_D$  0.33 nM) to a moderately abundant number of sites (97 fmol/mg of protein). These sites were characterized pharmacologically, by binding competition, observing two affinities for most ligands. The order of potency for agonists was: (a) for the high affinity sites: oximetazoline > epinephrine = norepinephrine > methoxamine; and (b) for the other sites (low affinity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-selective agonists): oximetazoline  $\geq$  epinephrine = norepinephrine  $\gg$  methoxamine. For antagonists the orders of potency were: (a) for the high affinity sites: *R*-(-)-5-[2-[(2-ethoxyphenoxy)ethylamino]propyl]-2-methoxybenzenesulfonamide HCl (tamsulosin)  $\geq$  2-(2,6-dimethoxyphenoxyethyl)-aminomethyl-1,4-benzodioxane (WB4101)  $\geq$  prazosin  $\geq$  (+)-niguldipine > 5-methyl-urapidil = benoxathian > phentolamine > 8-[2-{4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl}ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride (BMJ 7378); (b) for the other sites (low affinity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-selective antagonists): prazosin > tamsulosin > phentolamine = WB4101 > (+)-niguldipine  $\geq$  5-methyl-urapidil = benoxathian > BMJ 7378. These data strongly suggest that *Macaca mulatta* liver cells coexpress  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. Expression of the mRNA for these receptors was confirmed by reverse transcriptase-polymerase chain reactions.

**Keywords:**  $\alpha_1$ -Adrenoceptor; Liver; Hepatocyte; (Rhesus monkey)

### 1. Introduction

$\alpha_1$ -Adrenoceptors constitute a heterogeneous family of receptors; three subtypes have been cloned (Cotecchia et al., 1988; Schwinn et al., 1990; Lomasney et al., 1991; Perez et al., 1991). As recommended by the IUPHAR most recent consensus update (Hieble et al., 1995), the cloned receptors (lower case) are referred to as  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -, and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors which correspond to the pharmacologically defined (upper case)  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptors.

Catecholamines are among the main modulators of liver metabolism (Hems and Whitton, 1980), both  $\alpha_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors seem to mediate such modulation. The relative roles of these adrenoceptors and their densities in hepatocytes vary considerably among species (Sulakhe et al., 1988). It has been previously observed that there is

considerable variation in the subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptor expressed in the liver of animals of different species. Thus, rats (Han et al., 1987; García-Sáinz et al., 1992a, 1994), hamsters (García-Sáinz et al., 1994), mice (García-Sáinz et al., 1994), chickens (Gutiérrez-Venegas and García-Sáinz, 1993) and fish (*Ictalurus punctatus*) (García-Sáinz et al., 1995a) express the  $\alpha_{1B}$  subtype, whereas rabbits (García-Sáinz et al., 1992a, 1995d; Taddei et al., 1993), guinea pigs (García-Sáinz et al., 1992a,b, 1995d), dogs (García-Sáinz et al., 1995b) and humans (García-Sáinz et al., 1995c) express predominantly the  $\alpha_{1A}$  subtype in their livers.

Rhesus liver is a very frequently used model to study drug metabolism (Marselos and Tomatis, 1992), toxicology (Marselos and Tomatis, 1992; Thorgeirsson et al., 1994), carcinogenesis (Marselos and Tomatis, 1992; Thorgeirsson et al., 1994), and viral (Persidsky et al., 1994) and parasitic (Yang et al., 1994) infections. Surprisingly and, to the best of our knowledge, the adrenoceptors present in the liver of rhesus monkeys have not been characterized. The  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in the liver of rhesus monkey was investigated and the results are here

\* Corresponding author. Tel.: 011 (525) 622 5612; fax: 011 (525) 622 5613; e-mail: agarcia@ifscun1.ifisiol.unam.mx

presented. Our data indicate that rhesus liver coexpresses  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors.

## 2. Materials and methods

(-)-Epinephrine, (-)-norepinephrine, oxymetazoline, prazosin and guanylyl-imido-diphosphate (Gpp(NH)p) were obtained from Sigma Chemical Co. Benoxathian, 5-methyl-urapidil, 8-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-8-azaspiro[4.5]decane-7,9-dione dihydrochloride (BMY 7378) and 2-(2,6-dimethoxyphenoxyethyl)-aminomethyl-1,4-benzodioxane (WB4101) were from Research Biochemicals. Phentolamine (Ciba-Geigy), methoxamine (Burroughs Wellcome), *R*-(+)-5-[2-[(2-ethoxyphenoxy)ethyl]amino]propyl]-2-methoxybenzenesulfonamide HCl (tamsulosin) (Yamanouchi Europe) and (+)-niguldipine (Byk Gulden) were generous gifts from the indicated pharmaceutical companies. [ $^3$ H]Prazosin (71.8 Ci/mmol) was from New England Nuclear. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP (6000 Ci/mmol) and the Nick translation kit were obtained from Amersham. Restriction enzymes were obtained from New England Biolabs.

Rhesus monkeys (pathogen-free, obtained from Charles) were maintained and killed according to the principles and guidelines of our Institute and the NIH, to avoid any unnecessary pain to the animals. The monkeys were used for electrophysiological studies (Ruiz et al., 1995) in the laboratory of Dr Raulfo Romo, who kindly provided the livers of the animals to us, immediately after the animals were subjected to general anesthesia and sacrificed. Four animals with the following characteristics were used: (1) male, 5.5 kg,  $\approx$  3 years old; (2) female, 6.5 kg,  $\approx$  4.5 years old; (3) male, 3.5 kg,  $\approx$  3 years old; (4) male, 18 kg,  $\approx$  6.5 years old. Binding studies were performed with membranes from all the animals; no difference was observed among them and the data were pooled. Partially purified liver plasma membranes were obtained by the method of Neville (1968). Membranes were washed and resuspended in 50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5; aliquots of the membrane preparation were frozen and stored under liquid nitrogen until used (usually within two weeks), without any noticeable change in receptor binding. Radioligand binding studies were performed by incubating membranes (100–150  $\mu$ g protein) in 50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5 with the radioactive ligand, alone or with the indicated agents. Incubations were in a total volume of 0.25 ml for 60 min in a water bath shaker at 25°C. At the end of the incubation, 2.5 ml of ice-cold buffer were added to the membrane suspension, the membranes were immediately filtered on GF/C filters and washed three times (2.5 ml each time) with the same buffer. Saturation experiments were performed using concentrations between 0.05–12 nM [ $^3$ H]prazosin and binding competition studies with 1–1.5 nM of the radioactive ligand (75–85% receptor occupation). Non-specific binding was evaluated in the presence

of 10  $\mu$ M phentolamine; specific binding represented 70–80% of the total binding at the  $K_p$ . Binding competition experiments with agonists were performed in the presence of 100  $\mu$ M Gpp(NH)p. When the sensitivity to inactivation by chloroethylclonidine was tested, liver membranes were preincubated with different concentrations of this irreversible antagonist, washed and the specific binding at  $\approx$  80% saturation was determined. Binding saturation and competition data were analyzed using the EBDA and LIGAND (Munson and Rodbard, 1980) programs (Elsevier-Biosoft). Two-state fits were utilized only when this, more complex model, significantly improved the goodness of the fit.  $K_i$  values were calculated according to Cheng and Prusoff (1973). Protein was quantified by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard.

Total RNA was obtained by the method of Chomczynski and Sacchi (1987) with minor modifications. RNA integrity was routinely checked by electrophoresis on formaldehyde-containing agarose gels and visualization under UV light using ethidium bromide staining. Reverse transcriptase-polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed with total RNA using a kit from Perkin Elmer. The primers: 5'-CATCGTGGTCGGCTGCTTCGTC-CTCTGCTG-3' (coding sense) and 5'-TCCCACGGG-GATGCGCACCATGTCCTTG-3' (anticoding sense) corresponding to bases 1261–1290 and 1547–1576 of the human  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor cDNA (Hirasawa et al., 1993), were employed; the PCR amplification profile consisted of denaturation at 94°C for 1 min, primer annealing at 55°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min (40 cycles) using 5  $\mu$ g of total RNA. The primers 5'-GCTCCTTCTACATCCGCTCG-3' (coding sense) and 5'-AGAACCACCTTGAACACGG-3' (anticoding sense), corresponding to bases 629–649 and 983–1003 of the rat  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor cDNA (Voigt et al., 1990) were employed with the following PCR conditions: denaturation 95°C for 1 min, primer annealing at 58.5°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min (40 cycles) using 5  $\mu$ g of total RNA. RT-PCR mixtures were heated initially at 95°C for 3 min and at the end of the reaction cycles were incubated at 72°C for 7 min. The RT-PCR products were electrophoresed in 7.5% polyacrylamide gels, transferred to nylon membranes and hybridized under high stringency conditions (García-Sáinz et al., 1992a) with the whole bovine cDNA  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor (Schwinn et al., 1990) or the whole hamster (DDT<sub>1</sub> MF-2 cells)  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor cDNA (Cotecchia et al., 1988) labeled by Nick Translation (specific activity  $\approx$  10<sup>8</sup> cpm/ $\mu$ g).

## 3. Results

[ $^3$ H]Prazosin binding to rhesus monkey liver plasma membranes was rapid (reaching steady state in  $\approx$  5–7 min, data not shown) and saturable. A representative bind-

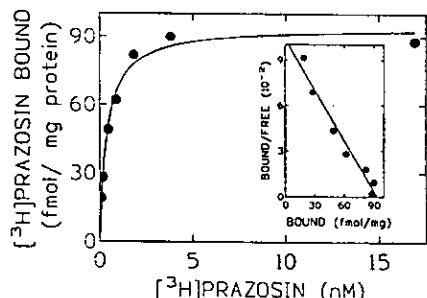


Fig. 1. [<sup>3</sup>H]Prazosin saturation isotherm using rhesus monkey liver membranes. Plotted are the specific bindings and the Rosenthal analysis (inset). These data are representative of 3 separate experiments with each of the 4 different membrane preparations.

ing saturation isotherm is presented in Fig. 1. It can be observed that [<sup>3</sup>H]prazosin binds with high affinity ( $K_D$   $0.33 \pm 0.03$  nM) to a moderately abundant number of sites ( $97 \pm 12$  fmol/mg of protein) (results are the means  $\pm$  S.E.M of 3 separate experiments performed with each of the four different membrane preparations). The Rosenthal transformation (Fig. 1, inset) of the data yielded a straight line, suggesting that [<sup>3</sup>H]prazosin binds to sites with homogeneous affinity for this radioligand.

Chloroethylclonidine is an alkylating antagonist that is able to irreversibly inactivate some  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Minneman, 1988). As it is shown in Fig. 2, preincubation with chloroethylclonidine dose dependently inactivated a large proportion of the [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites present in these membranes.

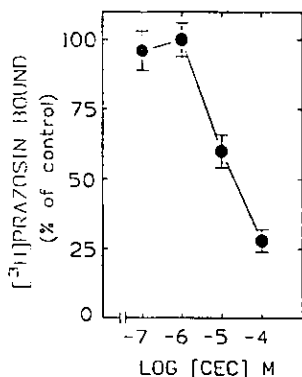


Fig. 2. Effect of chloroethylclonidine on [<sup>3</sup>H]prazosin specific binding. Membranes were preincubated with the indicated concentration of clorethylclonidine (CEC), washed and the specific [<sup>3</sup>H]prazosin binding determined. Results are presented as percentage of the specific binding observed in membranes preincubated without chloroethylclonidine (control). Plotted are the means and vertical lines represent the S.E.M. of 2 separate experiments using each of the 4 different membrane preparations.

We further characterized the [<sup>3</sup>H]prazosin binding sites present in these membranes by binding competition studies using selective agonists and antagonists. In preliminary experiments, it was observed that the slope of the competition for agonists was consistently much below 1, suggesting heterogeneity. Such heterogeneity could be due to the presence of several receptor subtypes, to the existence of more than one affinity state for agonists for a given receptor subtype, or to both, i.e., more than one receptor subtype each with more than one state of affinity for agonists. The last possibility proved to be correct. Studies with antagonists indicated receptor heterogeneity (i.e., the presence of more than one receptor subtype in the membrane preparations, see below). In addition, we observed that the hydrolysis-resistant analogue of GTP, Gpp(NH)p, shifted to the right and increased the slope, of the binding competition curve for epinephrine; the binding competition curve for an antagonist, such as phentolamine, was not modified by the GTP analogue (data not shown). These data suggested that guanine nucleotide-modulated interconversion of two affinity states for agonists was taking place, in agreement with the ternary complex model (De Lean et al., 1980; Samama et al., 1993). Therefore, in order to better characterize the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes present in rhesus monkey liver membranes we performed all binding competition experiments with agonists in the presence of 100  $\mu$ M Gpp(NH)p.

Binding competition experiments using agonists are presented in Fig. 3 and Table 1. It can be observed that the order of potency for the agonists was: oximetazoline > epinephrine  $\geq$  norepinephrine > methoxamine. Interestingly, in spite of the presence of Gpp(NH)p in the binding assays, the competition curves for oximetazoline and methoxamine were clearly biphasic and best fitted to a two-site fit (Fig. 3). The  $K_H$  and  $K_L$  values and the proportion of site with each affinity are presented in Table

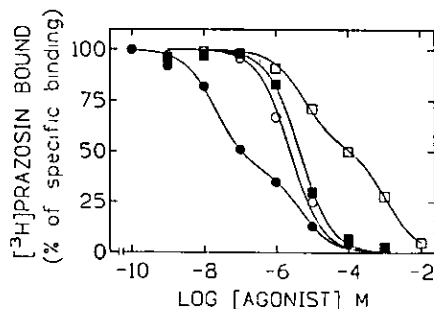


Fig. 3. Binding competition experiments with agonists using rhesus monkey liver membranes. The following agonists were employed: oximetazoline (filled circles), epinephrine (open circles), norepinephrine (filled squares) and methoxamine (open squares). The figure is representative of 4 separate experiments using each of the 4 different membrane preparations.

Table 1

Binding parameters derived from the competition by agonists and antagonists for [ $^3$ H]prazosin binding sites in rhesus monkey liver membranes

	$K_H$ (nM)	$K_L$ (nM)	$R_H$ (%)	$R_L$ (%)
<b>Agonists</b>				
Oximetazoline	6.38 ± 1.25	395 ± 144	41 ± 5	58 ± 5
(-)-Epinephrine	533 ± 69	-	100	-
(-)-Norepinephrine	830 ± 210	-	100	-
Methoxamine	1957 ± 502	265000 ± 26495	48 ± 4	51 ± 4
<b>Antagonists</b>				
Prazosin	0.26 ± 0.03	-	100	-
Tamsulosin	0.16 ± 0.05	3.60 ± 0.85	57 ± 7	42 ± 7
(+)-Niguldipine	0.64 ± 0.34	149 ± 52	50 ± 5	50 ± 5
WB4101	0.23 ± 0.04	20 ± 5	52 ± 6	48 ± 6
5-Methyl-urapidil	2.60 ± 0.05	210 ± 37	55 ± 5	45 ± 5
Benoxathian	3.00 ± 0.95	228 ± 33	63 ± 5	36 ± 5
Phentolamine	19 ± 2	-	100	-
BMY 7378	326 ± 42	-	100	-

Results are the means ± S.E.M. of 4-6 determinations using 4 different membrane preparations.

1. Binding competition curves with the natural catecholamines, epinephrine and norepinephrine, were consistently monophasic (Fig. 3 and Table 1).

In the binding competition studies using antagonists, we observed that only the curves for prazosin, phentolamine and BMY 7378 were monophasic and best fitted to a one-state fit (Fig. 4 and Table 1). In contrast, the competition curves for the other antagonists tested (tamsulosin, (+)-niguldipine, WB4101, 5-methyl-urapidil and benoxathian) were consistently biphasic and best fitted to two-state fits (Fig. 4 and Table 1). When two different affinities for an agent were detected, the proportion was  $\approx 1:1$ .

Using RT-PCR we detected a fragment of 316 bp using

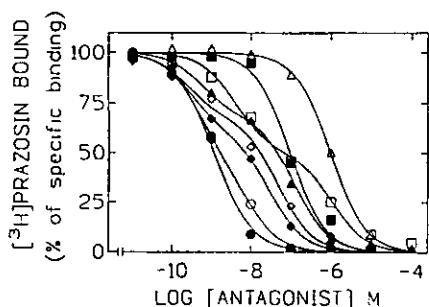


Fig. 4. Binding competition experiments with antagonists using rhesus monkey liver membranes. The following antagonists were employed: prazosin (filled circles), tamsulosin (open circles), (+)-niguldipine (filled diamonds), WB4101 (open diamonds), 5-methyl-urapidil (filled triangles), benoxathian (open squares), phentolamine (filled squares) and BMY 7378 (open triangles). The figure is representative of 4 separate experiments using each of the 4 different membrane preparations.

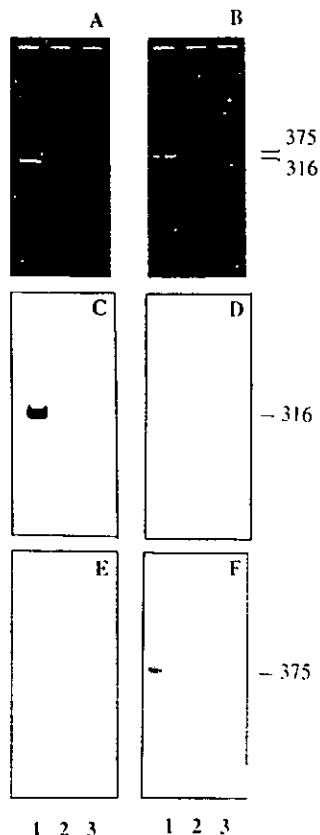


Fig. 5. RT-PCR and hybridization of the reaction products. Ethidium bromide-stained gels showing the RT-PCR products obtained using conditions for the  $\alpha_{1A}$  subtype (panel A) and for the  $\alpha_{1B}$  subtype (panel B) (lanes 1, complete reaction; lanes 2, reaction performed in the absence of RNA; lanes 3, reaction performed in the absence of reverse transcriptase). Gels identical to those in panels A and B were transferred to nylon membranes and hybridized with the labeled  $\alpha_{1A}$  cDNA (panels C and D) or with the labeled  $\alpha_{1B}$  cDNA (panels E and F); autoradiographs presented are representative of 3 different experiments with identical results.

the primers and conditions for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor and another fragment of 375 bp using the primers and conditions for the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor (Fig. 5, panels A and B). No such fragments were detected in the absence of RNA or reverse transcriptase (Fig. 5, panels A and B). The fragments had the sizes expected (comparable to those obtained using RNA from cells transfected with the cloned receptor subtypes (data not shown)). The identity of the fragments was further tested by hybridization with the whole bovine  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor cDNA (Fig. 5, panels C

and D) and with the whole hamster  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor cDNA (Fig. 5, panels E and F).

#### 4. Discussion

In the present study we characterized the  $\alpha$ -adrenoceptors of rhesus monkey liver. The characterization was performed using complementary approaches, radioligand binding and mRNA expression using RT-PCR. The results of both approaches were consistent and clearly indicate that in the liver of *Macaca mulatta*, two adrenoceptor subtypes, i.e., the  $\alpha_{1A}$ - and the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, are expressed.

Our laboratory has characterized the  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in the liver of different species. The number of sites detected in the liver of animals of different species varies markedly. We have observed values as high as 500-900 fmol/mg of membrane protein in the livers of rats, mice or hamsters (García-Sáinz et al., 1994) and as low as 30 fmol/mg membrane protein in fish liver (García-Sáinz et al., 1995a). Although differences in the recovery of plasma membrane protein during the isolation procedures exist, they do not seem to explain the enormous variations in receptor densities that we have observed. In this regard, the density of sites detected in rhesus monkey liver can be considered as moderately abundant.

The pharmacological characteristics of the [ $^3$ H]prazosin binding sites, detected in the present study, strongly suggest coexpression of  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. For antagonists: tamsulosin (Michel and Insel, 1994; García-Sáinz et al., 1995d), (+)-niguldipine (Boer et al., 1988), WB4101 (Morrow and Creese, 1986), 5-methyl-urapidil (Gross et al., 1988) and benoxathian (Michel et al., 1989) have considerable bigger affinity for  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors than for the other subtypes whereas prazosin is considered non selective for the different subtypes (Bylund et al., 1994). BMY 7378 is a selective antagonists ( $K_i \approx 2$  nM) for the  $\alpha_{1B}$  subtype (Goetz et al., 1995; Piascik et al., 1995). For the agonists: oximetazoline and methoxamine have also bigger affinity for the  $\alpha_{1A}$  subtype (Bylund et al., 1994). The order of potency for agonists for both binding sites was similar, i.e., (a) for the high affinity sites: oximetazoline > epinephrine = norepinephrine > methoxamine; and (b) for the other sites (low affinity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-selective agonists): oximetazoline  $\geq$  epinephrine = norepinephrine  $\gg$  methoxamine. For antagonists the orders of potency were as follows: (a) for the high affinity sites: tamsulosin  $\geq$  WB4101  $\geq$  prazosin  $\geq$  (+)-niguldipine > 5-methyl-urapidil = benoxathian > phenolamine > BMY 7378; (b) for the other sites (low affinity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor-selective antagonists): prazosin > tamsulosin > phenolamine = WB4101 > (+)-niguldipine  $\geq$  5-methyl-urapidil = benoxathian > BMY 7378. The orders of potency and the  $K_i$  values are consistent with the classification of these sites as representing  $\alpha_{1A}$ - and

$\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, respectively. The monophasic competition curve and the very low affinity for BMY 7378 strongly suggests that  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors are not present in rhesus liver membranes. It is important to mention that, as expected, the same ratio ( $\approx 1:1$ ) was consistently observed with all the agents that show subtype selectivity.

The binding results were confirmed by the molecular biological approach. We attempted to detect the expression of the receptor subtype mRNAs through Northern analysis, but the level of expression was apparently rather low, and the amount of signal was very small. Nevertheless, using RT-PCR the data clearly showed the expression of selective mRNA for both the  $\alpha_{1A}$  and the  $\alpha_{1B}$  subtypes.

Our data clearly indicated that the liver from the rhesus monkey coexpresses  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors.  $\alpha_{1A}$ -Adrenoceptors have been detected in the liver of rabbits (García-Sáinz et al., 1992a, 1995d; Taddei et al., 1993), guinea pigs (García-Sáinz et al., 1992a,b, 1995d), dogs (García-Sáinz et al., 1995b) and humans (García-Sáinz et al., 1995c), but not in the liver of animals of other species, more commonly used in the laboratory, such as rats (Han et al., 1987; García-Sáinz et al., 1992a, 1994), hamsters (García-Sáinz et al., 1994) or mice (García-Sáinz et al., 1994) which express the  $\alpha_{1B}$  subtype. At this point, it is not possible to define why some species express in their livers  $\alpha_{1A}$ - or  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors or both subtypes. The  $\alpha_{1B}$  subtype is expressed in the liver of lower vertebrates (such as fishes) whereas the  $\alpha_{1A}$  subtype is observed in the liver of higher vertebrates. This suggests that the former was probably expressed in this organ, earlier during evolution. It is interesting that the adrenergic innervation of mammalian liver seems to differ among species (Moghimzadeh et al., 1983) and that such innervation can be clearly detected in the livers of humans, guinea pigs, rabbits and also in the rhesus monkey, all of which express the  $\alpha_{1A}$  subtype, but that no such parenchymal innervation can be detected in the liver of rats or mice (which express the  $\alpha_{1B}$  subtype). Correlation between innervation and expression of a given subtype seems to exist but, at this point, there is no evidence for a causal relationship.

Detection of a receptor does not indicate the function that such receptor may have in an organ and even less if such receptor is relevant in a physiological context. As mentioned before, catecholamines are among the main modulators of liver metabolism (Hems and Whitton, 1980) in most species and  $\alpha_1$ -adrenoceptors play a cardinal role. In addition, there is evidence that  $\alpha_1$ -adrenoceptors are implicated in the control of hepatocyte proliferation (Cruise et al., 1987) and changes in the expression levels of this receptor family have been observed in regenerating and neoplastic hepatic tissue (Cruise et al., 1987; Kost et al., 1992). The physiological role(s) that these receptors play in the rhesus monkey remain to be determined. Finally, it is worth mentioning that the liver is a complex organ in which several cell types coexist and interact in a paracrine fashion. Therefore, the type of cells in which these recep-



tor subtypes are located within the whole organ seems also to be of major importance. The methodology employed, in this study, for membrane purification, predominantly isolates basolateral membranes from parenchymal cells. However, even among parenchymal cells, there is heterogeneity in function. Certainly, further experiments will be required to address all these aspects.

## Acknowledgements

The authors express their gratitude to Dr Ranulfo Romo for generously providing the liver of the animals used in this work. This research was partially supported by Grants from CONACyT (4711-N9406) and DGAPA (IN 200193).

## References

- Boer, R., A. Grassegger, C. Schudt and H. Glossmann, 1988. (+)-Niguldipine binds with very high affinity to  $Ca^{2+}$  channels and to a subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 172, 131.
- Bylund, D.B., D.C. Eikenberg, J.P. Hieble, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman, P.B. Molinoff, R.R. Ruffolo, Jr. and U. Trendelenburg, 1994. IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 121.
- Cheng, Y.-C. and W.H. Prusoff, 1973. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156.
- Cotecchia, S., D.A. Schwinn, R.R. Randall, R.J. Lefkowitz, M.G. Caron and B.K. Koblika, 1988. Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenoceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7159.
- Cruise, J.L., S.J. Knechtel, R.R. Bollinger, C. Kuhn and G.K. Michalopoulos, 1987.  $\alpha_1$ -Adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 6, 1189.
- De Lean, A., J.M. Stadel and R.J. Lefkowitz, 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled  $\beta$ -adrenoceptor. *J. Biol. Chem.* 255, 7108.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila, R. Alcántara-Hernández, M. Macías-Silva, J.A. Olivares-Reyes and C. González-Espínosa, 1992a. Species heterogeneity of hepatic  $\alpha_1$ -adrenoceptors:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 760.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila, J.A. Olivares-Reyes and M. Macías-Silva, 1992b. Guinea pig hepatocyte  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur. J. Pharmacol.* 227, 239.
- García-Sáinz, J.A., P. Casas-González, M.T. Romero-Avila and C. González-Espínosa, 1994. Characterization of the Hepatic  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci.* 54, 1995.
- García-Sáinz, J.A., J.A. Olivares-Reyes and M. Macías-Silva, 1995a. Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor of catfish hepatocytes. Functional and binding studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 111.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila and C. González-Espínosa, 1995b. Characterization of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of dog liver. Predominance of the  $\alpha_{1A}$ -subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 272, 139.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila and M.E. Torres-Márquez, 1995c. Characterization of the human liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Predominance of the  $\alpha_{1A}$  subtype. *Eur. J. Pharmacol.* 289, 81.
- García-Sáinz, J.A., M.T. Romero-Avila, R. Villalobos-Molina and K.P. Minneman, 1995d.  $\alpha_1$ -Adrenergic subtype selectivity of tamsulosin. Studies using liver from different species. *Eur. J. Pharmacol.* 289, 1.
- Goetz, A.S., H.K. King, S.D. Ward, T.A. True, T.J. Rimele and D.L. Saussy, Jr., 1995. BMY is a selective antagonist of the D subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 272, 85.
- Gross, G., G. Hanfl and C. Rugevics, 1988. S-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 151, 333.
- Gutiérrez-Venegas, G. and J.A. García-Sáinz, 1993. Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor of chicken hepatocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C, 797.
- Han, C., P.W. Abel and K.P. Minneman, 1987. Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenoceptor receptors revealed by chlorethyleclonidine. *Mol. Pharmacol.* 32, 505.
- Hems, D.A. and P.D. Whitton, 1980. Control of hepatic glycogenolysis. *Physiol. Rev.* 60, 1.
- Hieble, J.P., D.B. Bylund, D.E. Clarke, D.C. Eikenburg, S.Z. Langer, R.J. Lefkowitz, K.P. Minneman and R.R. Ruffolo, Jr., 1995. International Union of Pharmacology. X. Recommendations for nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* 47, 267.
- Hirasawa, A., K. Horie, T. Tanaka, K. Tagaki, M. Murai, J. Yano and G. Tsujimoto, 1993. Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 902.
- Kost, D.P., M.C. DeFrances, C.R. Lee and G.K. Michalopoulos, 1992. Patterns of  $\alpha_1$ -adrenoceptor receptor expression in regenerating and neoplastic hepatic tissue. *Pathobiology* 60, 303.
- Lomasney, J.W., S. Cotecchia, W. Lorenz, W.-Y. Leung, D.A. Schwinn, T.L. Yang-Feng, M. Brownstein, R.J. Lefkowitz and M.G. Caron, 1991. Molecular cloning and expression of the cDNA for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem.* 266, 6365.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Marselos, M. and L. Tomatis, 1992. Diethylstilbestrol: II. Pharmacology, toxicology and carcinogenicity in experimental animals. *Eur. J. Cancer* 29A, 149.
- Michel, A.D., D.N. Louty and R.L. Whiting, 1989. Identification of a single  $\alpha_1$ -adrenoceptor corresponding to the  $\alpha_{1A}$ -subtype in rat submaxillary gland. *Br. J. Pharmacol.* 98, 883.
- Michel, M.C. and P.A. Insel, 1994. Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 350, 136.
- Minneman, K.P., 1988.  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell  $Ca^{2+}$ . *Pharmacol. Rev.* 40, 87.
- Moghimzadeh, E., A. Nöbin and E. Rosengren, 1983. Fluorescence microscopic and chemical characterization of the adrenergic innervation in mammalian liver tissue. *Cell Tissue Res.* 230, 605.
- Morrow, A.L. and I. Creese, 1986. Characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [ $^3H$ ]WB4101 and [ $^3H$ ]prazosin binding. *Mol. Pharmacol.* 29, 321.
- Munson, P.J. and D. Rodbard, 1980. LIGAND: A versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems. *Anal. Biochem.* 107, 220.
- Neville, J., DM, 1968. Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 154, 540.
- Perez, D.M., M.T. Piasecki and R.M. Graham, 1991. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 40, 876.
- Persidsky, Y., S. Berger, J.L. Gendral, A.M. Sieffan, C. Royer, B. Hurrell, H.J. Stutte, A. Kinn and A.M. Aubertin, 1994. Signs of Kupffer cell involvement in productive simian immunodeficiency virus infection in nonkey liver. *Res. Virol.* 145, 229.

- Piasek, M.T., R.D. Guarino, M.S. Smith, E.E. Soltis, D.L. Saussy, Jr. and D.M. Perez, 1995. The specific contribution of the novel  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 1583.
- Ruiz, S., P. Crespo and R. Romo, 1995. Representation of moving tactile stimuli in the somatic sensory cortex of awake monkeys. *J. Neurophysiol.* 73, 525.
- Samama, P., S. Cotecchia, T. Costa and R.J. Lefkowitz, 1993. A mutation-induced activated state of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J. Biol. Chem.* 268, 4625.
- Schwinn, D.A., J.W. Lomasney, W. Lorenz, P.J. Szklut, R.T. Frameau, T.L. Yang-Feng, M.G. Caron, R.J. Lefkowitz and S. Cotecchia, 1990. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel  $\alpha_1$ -adrenergic subtype. *J. Biol. Chem.* 265, 8183.
- Sulakhe, S.J., V.B. Pulga and S. Tran, 1988. Hepatic  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in various animal species. *Mol. Cell. Biochem.* 83, S1.
- Taddei, C., E. Puggesi, A. Leonardi and R. Testa, 1993. Affinity of Different  $\alpha_1$ -agonists and antagonists for the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of rabbit and rat liver membranes. *Life Sci.* 53, PL177.
- Thorgeirsson, U.P., D.W. Dalgard, J. Reeves and R.H. Adamson, 1994. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 19, 130.
- Voigt, M.M., J. Kispert and H. Chin, 1990. Sequence of a rat brain cDNA encoding an  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor. *Nucleic Acid Res.* 18, 1053.
- Yang, C., W.E. Collins and P. Millet, 1994. Immunological characterization of *Plasmodium vivax* antigens using *Plasmodium cynomolgi* liver stage-primed immune sera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 365.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adachi, M Y., Yang, Y., Trezeciak, A., Furuichi Y and Miyamoto, C. (1992). Identification of a domain of ET<sub>A</sub> receptor required for ligand binding. FEBS Lett. 311: 179-183.
- Ahlquist, RP. (1948). A study on the adrenotropic receptors. Am J Physiol. 153:586-600.
- Berridge, M.J. (1985). The molecular basis of between cells. Sci. Am. 253: 142-147.
- Boer, R., Grassegger, A., Schudt, C., Glossmann, H. (1988) (+)-Niguldipine binds with very high affinity to Ca<sup>2+</sup> channels and to a subtypes of α<sub>1</sub>-adrenoceptors. Eur. J. Pharmacol. 172:131-145.
- Boyer, JL., García, A., Posadas, C., and García-Sáinz, JA. (1984). Differential effect of pertussis toxin on the affinity state for agonist of renal α<sub>1</sub>- and adrenoceptors. J. Biol. Chem. 259: 13: 8076-8079.
- Boyer, JL., Waldo, GL., Harden, TK., (1992). βγ-subunits activation of G-protein-regulated phospholipase C. J. Biol. Chem. 267:25451-56.
- Bruno, J F., Whittaker, J., Song, J and Berelowtz, M. (1991) Molecular cloning and secuencing of a cDNA encoding a human α<sub>1A</sub> adrenergic receptor. Biochem Biophys Res Communicat. 179: 1485-1490.
- Cheng, Y. C. and W.H. Prusoff, (1973). Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition of an enzymatic reaction. Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3105.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi, (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159.

Coates, J., Jahn, U., and Weetman, D.F. (1982) The existence of a new subtype of  $\alpha$ -adrenoceptor is revealed by SGD 100/75 and phenoxybenzamine. *Br. J. Pharmacol.* 75: 549-552.

Corvera, S., and Garcia-Sáinz, JA. (1981).  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation stimulates ureogenesis in rat hepatocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 387-390.

Corvera, S., Bahena-Huerta, J., and Garcia-Sáinz, JA. (1982) Stimulation of ureogenesis through  $\alpha_1$  and  $\beta$ -adrenoreceptors in juvenile rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* 82:89-91.

Corvera, S., and Garcia-Sáinz, JA. (1983) Hypothyroidism abolishes the glycogenolytic effect of vasopressin angiotensin II and A23187 but not that of  $\alpha_1$ -adrenergic amines in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 153, 366-368.

Corvera, S., Hernandez-Sotomayor, SMT and Garcia-Sainz, JA. (1984) Modulation by thyroid status of cyclic AMP-dependent and  $Ca^{2+}$ -dependent mechanisms of hormone action in rat liver cells. *Biochim Biophys Acta.* 803: 95-105.

Cotecchia, S., Schwinn, DA., Randall, RR., Lefkowitz, RJ., Caron, M.G and Kobilka, B.K. (1988). Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster  $\alpha_1$ -adrenergic receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 , 7159-7166.

Cotecchia, S., Exum, S., Caron, M.G, Lefkowitz, R. (1990a). Regions of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor involved in coupling to phosphatidylinositol hydrolysis and enhanced sensitivity of biological function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:2896-900.

Cotecchia S., Kobilka, B.K., Daniel, K.W., Nolan, R.D., Lapetina, E.Y. (1990b). Multiple second messenger pathways of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 265: 63-69.

- Cotecchia, S., Ostrowski, J., Kjelsberg, M.A., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992). Discrete amino acid sequences of the  $\alpha_1$ -adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 267:1633-39.
- Fain, J.N., and Garcia-Sáinz, J.A. (1980). Role of phosphatidylinositol turnover in  $\alpha_1$  and of adenylate cyclase inhibition in  $\alpha_2$  effects of catecholamines. *Life Sci.* 26: 1183-1186.
- Faure, C., Pimoule, C., Vallancien, G., Langer, S.Z., and Graham, D. (1994a). Identification of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype present in the human prostate, *Life Sci.* 54: 1595-1605.
- Faure, C., Pimoule, C., Arbuta, S., Langer, S.Z., and Graham, D. (1994b). Expression of  $\alpha_1$ -adrenoreceptor subtypes in rat tissues: implications for  $\alpha_1$ -adrenoreceptor classification. *Eur. J. Pharmacol.* 268: 141-149.
- Faure, C., Gourhier, C., Langer, S.Z., Graham, D. (1995). Quantification of  $\alpha_1$ -adrenoreceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 935-943.
- Feng, Y.H., Noda, K., Saad, Y., Liu, X.P., Husain, A. and Karnik, S.S. (1995). The docking of Arg<sup>2</sup> of angiotensin II with Asp<sup>281</sup> of AT<sub>1</sub> receptor is essential for full agonism. *J. Biol. Chem.* 270: 12846-12850.
- Fong, T. M., Casciere, M.A., Bansal, H. Yu., Swain, C., and Strader, C.D. (1993) Amino-aromatic interaction between histidine 197 of the neurokinin-1 receptor and CP 96345. *Nature.* 362: 350-353.
- Franke, R. R., Koning, B., Sakmar T. P., Khorona, H. G., and Hoffmann, K. P. (1990). *Science.* 250: 123-125.
- Garcia-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1985) Adrenergic regulation of gluconeogenesis: Possible involvement of two mechanisms of signal transduction in  $\alpha_1$ -adrenergic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6727-6730.

García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. and Tussié-Luna, M.I. (1986) Homologous and heterologous desensitization of one of the pathways of the  $\alpha_1$ -adrenergic action. Effects of epinephrine, vasopressin, angiotensin II and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Biochem. Biophys. Acta.* 887: 73-79.

García-Sáinz, J.A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Tsujimoto, G., and Hoffman, B.(1985b). Differential effects of adrenergic agonist and phorbol esters on the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of hepatocytes and aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 112: 393-397.

García-Sáinz, J.A.(1987). Pathways of the  $\alpha_1$ -adrenergic action. Comparison with V1- vasopressin and A<sub>1</sub>-angiotensin. *Circulation Research* 61 (suppl. II) 1-5.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Olivares-Reyes, J.A., and Macías-Silva, M. (1992a), Guinea pig hepatocyte  $\alpha_{1A}$ -adrenoreceptors: characterization, signal transduction and regulation, *Eur. J. Pharmacol.* 227: 239-245.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Alcántara-Hernández, R., Olivares-Reyes, J.A., Macías-Silva, M. and González-Espinosa, C. (1992b). Species heterogeneity of hepatic  $\alpha_1$ -adrenoreceptors:  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1C}$  subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 760-767.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Alcántara-Hernández, R., Olivares-Reyes, J.A. (1993a). Different sensitivity to methoxamine and oxymetazoline of hepatocytes expressing  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  or  $\alpha_{1C}$ -adrenoreceptors. *Pharmacol. Commun.* 2:339-334.

García-Sáinz, J.A.(1993b).  $\alpha_1$ -adrenergic action: receptor subtypes, signal transduction and regulation. *Cell. Signalling* 5: 539-547.

García-Sáinz, J.A and Romero-Avila, M. T. (1993c). Characterization of the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using 5-[<sup>3</sup>H] methylurapidil. *Mol. Pharmacol.* 44: 589-594.

García-Sáinz, J.A., Casas-González, P., Romero-Avila, M.T., González-Espinosa, C. (1994). Characterization of the hepatic  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci.* 54: 1995-2003.

García-Sáinz, J.A. (1995a). Adrenaline and its receptors: One hundred years of research. *Archives of Medical Research.* 26: 205-211.

García-Sáinz, J.A., Olivares-Reyes, J.A. and Macías-Silva, M. (1995b). Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor of the catfish hepatocytes. Functional and binding studies, *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 111-120.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., and González-Espinosa, C. (1995c). Characterization of the  $\alpha_1$ -adrenoceptors of the dog liver. Predominance of the  $\alpha_{1A}$ -subtype, *Eur. J. Pharmacol.* 272: 139-143.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Villalobos-Molina, R., Minneman, K.P. (1995d).  $\alpha_1$ -adrenergic subtype selectivity of tamsulosin. Studies using liver from different species. *Eur. J. Pharmacol.* 289: 1-7.

García-Sáinz, J.A. and Macías-Silva, M. (1995e). Species heterogeneity of liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors: subtypes, signal transduction and regulation. *Pharmacol. Commun.* 1: 53-60.

Goodman and Gilman's. (1996). *The pharmacological basis of therapeutics.* 9a Ed. Editorial McGraw Hill. San Francisco. pags. 199-225.

Graham, R.M., Perez, D., Hwa, J., and Piascik, M.T. (1996).  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function and signaling. *Circ. Res.* 78:737-749.

Gross, G., Hanft, G., and Rugevics, C. (1988). 5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.* 151: 333-335.

- Gross, G., Hanft, G., Mehdorn, H.M. (1989). Demonstration of  $\alpha_{1A}$  - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoreceptor binding sites in human brain tissue. *Eur. J. Pharmacol.* 169: 325-328.
- Gutiérrez-Venegas, G., and García-Sáinz, J.A. (1993). Characterization of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors of chicken hepatocytes, *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 797-785.
- Han, C., Minneman, K.P. (1991). Interaction of subtypes-selective antagonists with  $\alpha_1$ -adrenergic receptor binding sites in rat tissues. *Mol. Pharmacol.* 40:531-538.
- Han, C., Abel, P.W. and Minneman, K.P. (1987). Heterogeneity of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors revealed by chlorethylclonidine, *Mol. Pharmacol.* 32: 505- 510.
- Hanft, G., Gross, G., Beckering, J.J., Korstanje, C. (1989).  $\alpha_1$ -adrenoreceptors: the ability of various agonist and antagonist to discriminate between two distinct [ $^3$ H] prazosin binding sites. *J. Pharm. Pharmacol* 41: 714-716.
- Hedin, K.E., Duerson, K., Clapham, D.E. (1993). Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal. *Cell Signal.* 5:505-518.
- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., and Ruffolo, R.R. Jr. (1995). International Union of Pharmacol. X. Recommendation for nomenclature of  $\alpha_1$ -adrenoceptors: consensus update, *Pharmacol. Rev.* 47: 267-270.
- Hirasawa, A., Horie, K., Tanaka, T., Takagaki, K., Murai, M., Yano, J., Tsujimoto, G. (1993). Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 902-909.
- Huerta-Bahena, J., Villalobos-Molina, R., García-Sáinz, J.A. (1982). Cycloheximide an adrenergic agent. *Life Sci.* 30:1757-1762.



- Huerta-Bahena, J., García-Sáinz, J.A. (1985). Possible involvement of two mechanisms of signal transduction in  $\alpha_1$ -adrenergic action. Selective effect of cycloheximide. *Biochim. Biophys. Acta.* 845:131-137.
- Hwa, J., Graham, R. M., Perez, D. M. (1995). Identification of critical determinants of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype-selective agonist binding. *J. Biol. Chem.* 270: 23189-23195.
- Keppens, S., Vandekerckhove, A., Moshage, H., Yap, S.H., Aers, R. and De Wouff, H. (1993). Regulation of glycogen phosphorylase activity in isolated human hepatocytes. *Hepatology.* 17: 610-617.
- Kjelsberg, M.A., Cotecchia, S., Ostrowski, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992). Constitutive activation of the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor by all amino acid substitutions at a single site. Evidence for a region which constrains receptor activation. *J. Biol. Chem.* 267:1430-1433.
- Klijn, K., Slivka, S.R., Bell, K. and Insel, P.A. (1991). Renal  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes: MDCK-D1 cells, but not rat cortical membranes possess a single population of receptors. *Mol. Pharmacol.* 39: 407-413.
- Kobilka, B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 15:87-114.
- Langer, S.Z. (1977). Presynaptic receptors and their role in the regulation of transmembrane release. *Br. J. Pharmacol.* 60: 481-492.
- Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P., Brown, J.T.G. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature.* 214: 597-561.
- Lee, C.H., Park, D., Wu, D., Rhee, S.G., Simon, M.I. (1992). Members of the  $G_q$ - $\alpha$  subunit gene family activate phospholipase  $C_\beta$  isozymes. *J. Biol. Chem.* 267: 16044-47.

- Lomasney, J.W., Allen, L.F., Capel, D. and Lefkowitz, R.J. (1993). Clin. Resp. 41: 264A.
- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R.J., Caron, M.C. (1991). Molecular biology of  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structure-function relationships. Biochim. Biophys. Acta. 1095:127-139.
- Maurice, D.H., Waldo, G.L., Morris, A.J., Nicholas, R.A., Harden, T.K. (1993). Identification of  $G\alpha_{11}$  as the phospholipase C-activating G-protein in turkey erythrocytes. Biochem. J. 290: 765-70.
- Maniatis, T., Sambrook, J and Fritsch, E.F. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. New York. p.3.86-4.5.
- Michel, M. C., and Insel, P.A.(1994). Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue  $\alpha_1$ -adrenoreceptor subtypes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 350: 136-142.
- Ming-Ming, Z., Hwa, J. and Perez, D. (1996). Identification of critical extracellular loop residues involved in  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype antagonist binding. Mol. Pharmacol. 50:1118-1126.
- Minneman, K.P., Esbenschade, T. A. (1994).  $\alpha_1$ - Adrenergic receptor subtypes. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 34: 117-133
- Minneman, K.P. (1988).  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. Pharmacol Rev. 40: 87-119.
- Morrow, A.L. and Crrese, I. (1986). Characterization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in rat brain: A reevaluation of  $^3\text{H}$  WB4101 and  $^3\text{H}$  prazosin binding. Mol. Pharmacol. 29: 321-330.
- Munson, P. J. and Rodbard, D. (1980). LIGAND: A versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems. Anal Biochem. 107, 220-226.

- Nebigil, C. and Malik, K.U. (1992). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263: 987-996.
- Neville, J.D.M. (1968). Isolation of an organ specific protein antigen from cell-surface membrane of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta.* 154: 540-548.
- Oliver, G., Schäfer, E. A. (1895). The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *J. Physiol.* 18:230-232.
- Pang, I-H., Sternweis, P.C. (1990). Purification of unique  $\alpha$  subunits of GTP-binding regulatory proteins (G proteins) by affinity chromatography with immobilized  $\beta\gamma$  subunits. *J. Biol. Chem.* 265: 18707-12.
- Perez, D.M., Piasick, M. T., Graham, R. M. (1991). Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 40: 876-889.
- Perez, D.M., De Young, M.B., Graham, R.M. (1993). Coupling of expressed  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* 44: 784-793.
- Perez, D.M., Piasick, M.T., Malik, N., Gaivin, R. and Graham, R.M. (1994). Cloning, expression, and tissue distribution of the rat homolog of the bovine  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor provide evidence for its classification as the  $\alpha_{1A}$  subtype. *Mol. Pharmacol.* 46: 823-831.
- Piasick, M. T., Guarino, R. D., Smith, M. S., Soltis, E.E., Saussy, D. L., Perez, D. M. (1995). The specific contribution of the novel  $\alpha_1$ -adrenoreceptor to the contraction of vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:1583-1589.
- Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D. and Schwinn, D.A. (1994). Localization of mRNA for three distinct  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* 40: 171-175.

- Price, D.T., Chari, R.S., Berkowitz, D., Meyers, W. D., Schwinn, D.A. (1994). expression of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells: implications  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype classification. *Mol. Pharmacol.* 46: 221-226.
- Pushpendran, C., Corvera, S., García-Sáinz, J.A. (1984). Effect of insulin on  $\alpha_1$ -adrenergic actins in hepatocytes from euthyroid and hypothyroid rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118: 451-460.
- Rokosh, D.G., Bailey, B.A, Stewart, A.F.R., Karns, L.R., Long C.S. and Simpson, P.C. (1994). Distribution of  $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with  $\alpha_{1B}$  and  $\alpha_{1D}$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200:1177-1184.
- Ruffolo, R.R.Jr., Waddell, J.E., Yalen, E.L. (1982). Heterogeneity of postsynaptic  $\alpha$ -adrenergic receptors in mammalian aortas. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 221: 309-314.
- Ruffolo, R.R.Jr. (1984). Interactions of agonist with peripheral  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. *Fed. Proc.* 43: 2910-2916.
- Ruiz, S., Crespo, P. and Romo, R. (1995). Representation of moving tactile stimuli in the somatic sensory cortex of awake monkeys. *J. Neurophysiol.* 73:525-532.
- Savarese, T.M, Fraser, C.M. (1992). In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 283:1-19.
- Schwinn, D. A., Lomasney, J.W., Lorenz, W., Szklut, P.J., Franeau, R.T., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., and Cotecchia, S. (1990). Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel  $\alpha_1$ -adrenergic subtype. *J. Biol. Chem.* 265: 8183-8191.
- Schwinn, D.A., Page, S.O., Middleton, J.P., Lorenz, W., Liggett, S.B., Yamamoto, K., Lapetina, E., Caron, M. G., Lefkowitz, R.J., and Cotecchia, S. (1991). The

- $\alpha_{1C}$ -adrenergic receptor: Characterization of signal transduction pathways and mammalian tissue heterogeneity. *Mol. Pharmacol.* 40: 619-626.
- Schwinn, D. and Lomasney, J.W. (1992). Pharmacologic characterization of cloned  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype. *Mol. Pharmacol.* 227: 433-436.
- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Bronw, K.O., Sternweis, P.C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified  $G_q$ . *Science.* 251: 804-807.
- Strathmann, M. and Simon, M. I. (1990). G protein diversity: A distinct class of  $\alpha$  subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:9113-17.
- Taddei, C., Poggesi, E., Leonardi, A. and Testa, R. (1993). Affinity of rabbit and rat liver membranes. *Life Sci.* 53: PL 177-183.
- Taylor, S.J., Exton, J.H. (1991). Two  $\alpha$  subunits of the  $G_q$  class of G proteins stimulate phosphoinositide phospholipase C  $\beta 1$  activity. *FEBS Lett.* 286: 214-16.
- Torres-Márquez, M.E., Villalobos-Molina, R., and García-Sáinz, J.A. (1991).  $\alpha_1$ -adrenoreceptor subtypes in aorta ( $\alpha_{1A}$ ) and liver ( $\alpha_{1B}$ ). *Eur. J. Pharmacol.* 206: 199-202.
- Tsai, M.J and O'Malley, B.W. (1994) Molecular Mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63: 451-486.
- Vernier, P., Cardinaud, B., Valdenaire, O., Hervé, P. and Vincent, J.D. (1995). An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family. *TIPS* 16: 375-381.
- Villalobos-Molina, R., Hong, M.U. and García-Sáinz, J.A. (1982). Correlation between phosphatidylinositol labeling and contraction in rabbit aorta: Effect of the  $\alpha_1$ -adrenergic activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 222:258-264.

Voigt, M.M., Kispert, J. and Chin, H. (1990). Sequence of a rat brain cDNA encoding an  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor. *Nucleic. Acid. Res.* 18: 1053-1061.

Waldo, G.L., Boyer, J.L., Morris, A.J., Harden, T.K. (1991). Purification of  $AlF_4^-$ - and G-protein  $\beta\gamma$ -subunit-regulated phospholipase C-activating protein. *J. Biol. Chem.* 266: 14217-14225.

Wang, C.D., Buck, M.A. and Fraser, C.M. (1991). *Mol Pharmacol.* 40:168-179.

Wong, S.K., Ross, E.M. (1994). Chimeric muscarinic cholinergic:  $\beta$ -adrenergic receptors that are functionally promiscuous among G-proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 18968-18976.

Wu, D., Katz, A., Lee, C.H., Simon, M.I. (1992). Activation of phospholipase C by  $\alpha_1$ -adrenergic receptors is mediated by the  $\alpha$  subunits of  $G_q$  family. *J. Biol. Chem.* 267: 25798-25802.