

13
2E



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Modulación del calcio intracelular por Bradicinina en Hepatocitos C9"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

SELMA ERÉNDIRA AVENDAÑO VÁZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS ADOLFO GARCÍA SÁINZ

1999

277260



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

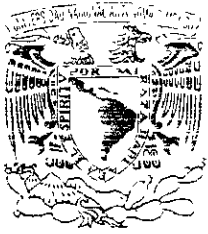
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

FANTASIA

DISCONTINUA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Modulación del calcio intracelular por Bradicininina en
Hepatocitos C9"

realizado por Selma Eréndira Avendaño Vázquez

con número de cuenta 9122631-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

Propietario

Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Propietario

M. en I. B. B. Rocío Alcántara Hernández

Suplente

M. en C. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

M. en C. Aurora Zlotnik Espinosa

COMISIÓN DE CIENCIAS

Selma Eréndira Avendaño Vázquez

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna María Suárez Díaz

Coordinadora de Licenciatura

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular en la UNAM, bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz con el apoyo de CONACyT (27569) y DGAPA (IN200596).

ÍNDICE

I. Resumen	2
II. Introducción	3
1. Comunicación celular	3
1.1 Tipos de comunicación celular	4
1.2 Receptores citoplásmicos	6
1.3 Receptores membranales	7
2. Receptores de siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas G (GPCRs)	9
2.1 Proteínas G	12
2.2 Vías de transducción	13
2.2.1 Vía de la Adenilato ciclasa	14
2.2.2 Vía del recambio de fosfoinosítidos / calcio	15
2.3 Regulación y desensibilización	18
3. La bradicinina	20
3.1 Procesos fisiológicos en los que interviene la bradicinina	23
3.2 Tipos de receptores para bradicinina	25
3.3 Genética de los receptores de bradicinina	26
3.4 Estructura del receptor B2 para bradicinina	26
3.5 Vías a las que se acopla el receptor B2	28
3.6 Regulación de la señal de bradicinina	29
III. Antecedentes particulares del trabajo experimental	31
IV. Hipótesis	31
V. Objetivos	31
VI. Materiales y métodos	32
VII. Resultados	33
VIII. Discusión	36
IX. Conclusiones	39
X. Referencias bibliográficas	40

I. Resumen

En las células C9 de hígado (originarias de rata) la bradicinina y la kalidina incrementaron (~2 veces) la concentración de calcio intracelular, mientras que el agonista selectivo B1, des-Arg⁹-bradicinina no lo hizo. El efecto de la bradicinina fue inhibido por los antagonistas selectivos B2, Hoe 140 y N- α -adamantaneacetil-D-Arg-[Hyp³,Thi^{5,8},D-Phe⁷]-bradicinina, pero no fue inhibido por el antagonista selectivo B1, des-Arg⁹-[Leu⁸]-bradicinina. La acción de la bradicinina fue disminuida pero no abolida por completo en medio sin calcio. El péptido fue capaz de aumentar la concentración de calcio intracelular en células tratadas con tapsigarguina. La acción de la bradicinina no se observó en células previamente estimuladas con este mediador local; sin embargo, bajo las mismas condiciones otra hormona, la angiotensina II, sí induce un claro incremento en la concentración de calcio intracelular.

Los datos indican que la activación de receptores B2 de bradicinina incrementan la concentración de calcio intracelular, tanto por la entrada extracelular de calcio como por la movilización intracelular de este catión en las células C9. Además se observó que el receptor B2 en estas células es objeto de desensibilización homóloga.

II. Introducción

1. Comunicación celular.

La célula, como la queremos imaginar, formando un sólo organismo o formando parte de un tejido, tiene la capacidad de interactuar con el medio, de recibir información y responder a ella. Ésta característica entre otras le ha permitido sobrevivir durante millones de años.

Este proceso de comunicación con el medio, que es complicado de imaginar en un organismo unicelular, en un organismo pluricelular resulta aún más complejo. El flujo de señales nos podría parecer enloquecedor, pero las células deben responder a varias señales simultáneamente.

Una vía de comunicación inicia con la síntesis y liberación de una molécula que actúa como primer mensajero. Este mensajero viaja por el líquido intersticial o vía torrente sanguíneo hasta el lugar donde actúa, esto es, hasta las células blanco o diana; éstas reconocen al mensajero, interpretan la información y responden. El reconocimiento del mensajero depende de la presencia de receptores específicos para él en las células blanco. La unión del receptor con el mensajero es responsable de la activación de una o varias vías de transducción que llevan la información del exterior al interior celular. La interacción del mensajero con el receptor puede estimular la producción de moléculas denominadas segundos mensajeros y que se encargan de amplificar la señal. El resultado es un cambio en el metabolismo y/o en la expresión génica de la célula.

El primer mensajero, después de iniciar la señal, tiene un destino muy variado. Puede separarse del receptor y ser degradado en el espacio extracelular o puede ser recapturado por las células vecinas y ser reciclado o degradado por éstas; también puede permanecer unido al receptor e internalizarse junto con él para ser reciclado o degradado.

En la comunicación celular se encuentran involucrados varios tipos de mensajeros, los cuales pueden ser de naturaleza peptídica como el glucagon, la angiotensina, la insulina, la somatostatina, todas las hormonas liberadas por el hipotálamo (como la hormona liberadora de tirotropina), las liberadas por la glándula pituitaria (corticotropina y vasopresina), las hormonas pancreáticas, y algunos factores de crecimiento; puede tratarse de lípidos como es el caso de los glucocorticoides y otros esteroides; de aminos, como la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina; o bien de aminoácidos y algunos de sus derivados como la glicina y el ácido gama-amino butírico (GABA). Puede incluso tratarse además de gases disueltos como el óxido nítrico (Goodman & Gilman, 1996).

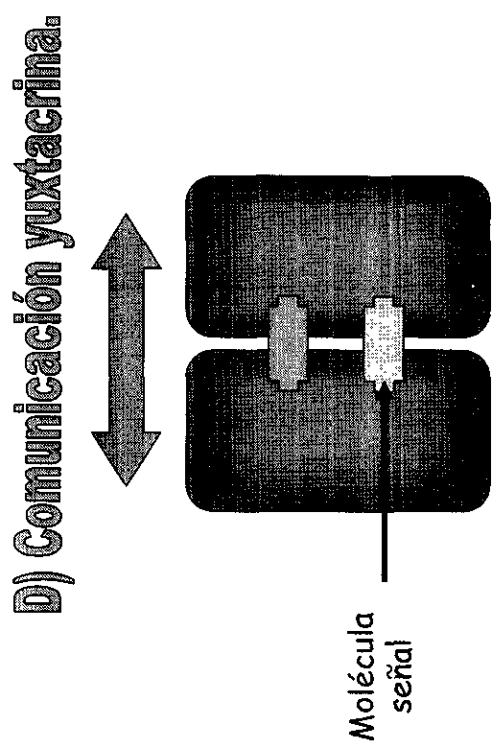
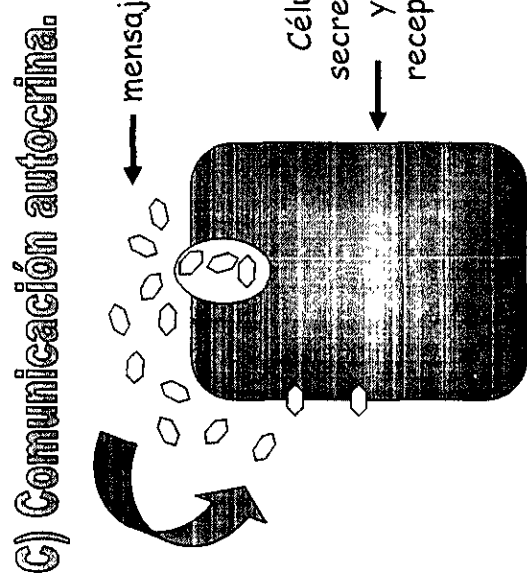
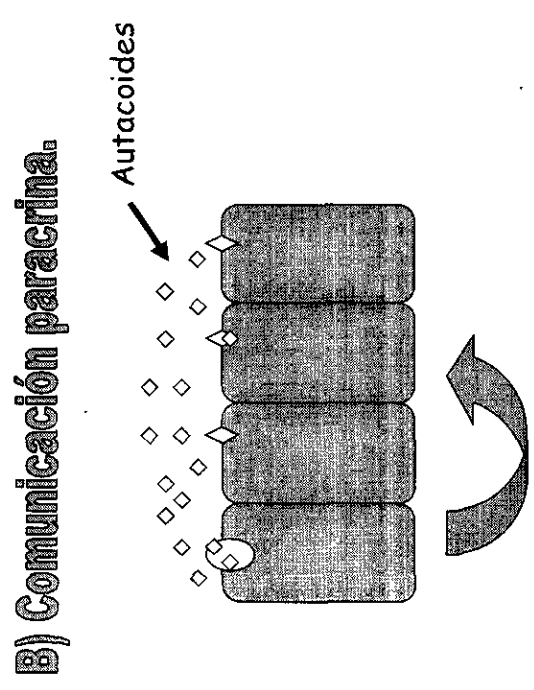
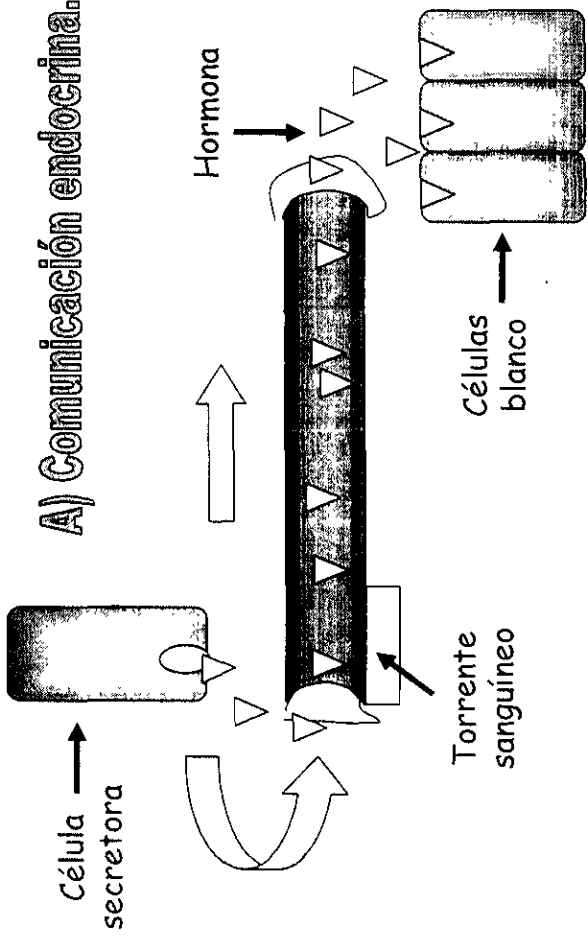


Fig.1 Tipos de comunicación celular. A) Endocrina, el mensajero viaja por el torrente sanguíneo hasta las células blanco que se encuentran distantes. B) Paracrina, los mensajero actúan sobre las células vecinas. C) Autocrina, la célula responde a mensajeros secretados por ella misma. D) Yuxtacrina, las células establecen comunicación con las células adyacentes mediante moléculas ancladas en la superficie de la membrana plasmática.

Estos mensajeros se clasifican con base en su naturaleza química según sean hidrofílicos o hidrofóbicos. Los mensajeros hidrofóbicos o liposolubles, como los esteroides, la tiroxina y el ácido retinoico, dada su naturaleza difunden a través de la membrana plasmática e interactúan con receptores que se encuentran en el citosol o en el núcleo. La unión de estos complejos, mensajero-receptor, a regiones reguladoras en el DNA afecta la expresión de ciertos genes. Los mensajeros hidrofílicos, como las catecolaminas, los aminoácidos y los péptidos, se unen a los receptores que se encuentran en la superficie de la membrana plasmática y dependerán de vías de transducción para llevar a cabo sus efectos fisiológicos (Goodman & Gilman, 1996).

Existen también moléculas lipofílicas que no atraviesan la membrana plasmática, y se unen a receptores de superficie, como son las prostaglandinas, que modulan la respuesta a otras hormonas (Goodman & Gilman, 1996).

La naturaleza química de la hormona o mensajero trae consigo otras implicaciones; por ejemplo, se sabe que las hormonas hidrofílicas incluyendo mensajeros químicos locales y neurotransmisores, generalmente son degradados cerca de su sitio de síntesis a poco tiempo de su liberación, y por ello suelen mediar respuestas de corta duración; en cambio las hormonas hidrofóbicas (con excepción de las prostaglandinas y tromboxanos que actúan como mediadores locales) pueden permanecer en el torrente sanguíneo durante horas y algunas durante días, mediando respuestas crónicas.

Las respuestas celulares mediadas por receptores se rigen bajo leyes fisicoquímicas, siendo un factor muy importante la concentración de los mensajeros. Las hormonas se encuentran, generalmente, muy diluidas en el torrente sanguíneo y fluido intersticial. De hecho, actúan a concentraciones que van del orden nanomolar al orden picomolar (de 10^{-9} M a 10^{-12} M).

Además, la vida media de los mensajeros depende de qué tan cerca sea liberado de la célula diana y de cuánto tiempo se mantiene en circulación para poder interactuar con su célula blanco. Existen mensajeros que actúan muy cerca de su sitio de síntesis y otros que viajan grandes distancias por el torrente sanguíneo. El que estos mensajeros viajen "grandes distancias" y sean reconocidos sólo por las células blanco a las que están dirigidos, habla de la alta especificidad que existe entre el mensajero y su receptor.

1.1 Tipos de comunicación celular.

Dependiendo de la distancia que recorre el mensajero hasta la célula blanco, se han identificado varios tipos de comunicación celular (Fig. 1).

A. La comunicación endocrina u hormonal (Fig 1A). Los mensajeros, llamados hormonas, son secretados por células que constituyen glándulas de secreción interna (como la hipófisis, la glándula tiroides, los islotes del páncreas, las suprarrenales, los ovarios y los testículos). Las hormonas viajan por el torrente circulatorio hasta las células receptoras, (la insulina y la adrenalina son ejemplos de hormonas). Dentro de este tipo de comunicación se encuentra la conocida como secreción neuroendocrina o neurosecreción (Fig. 2C) en la que células diferenciadas en tejido nervioso vierten sus mensajeros (neurohormonas) al torrente sanguíneo (Alberts. *et al.*, 1994; García-Sáinz, 1996; Voet y Voet, 1992).

B. Comunicación paracrina (Fig. 1B). Las células secretan mediadores químicos locales (hormonas locales o también llamados autacoides, término que proviene del griego *auto*= propia y *akos*= remedio) los cuales actúan solamente sobre las células vecinas. Estos mensajeros generalmente tienen una vida media muy corta y son rápidamente destruidos. Las prostaglandinas y los factores polipeptídicos del crecimiento son ejemplos de hormonas paracrinas.

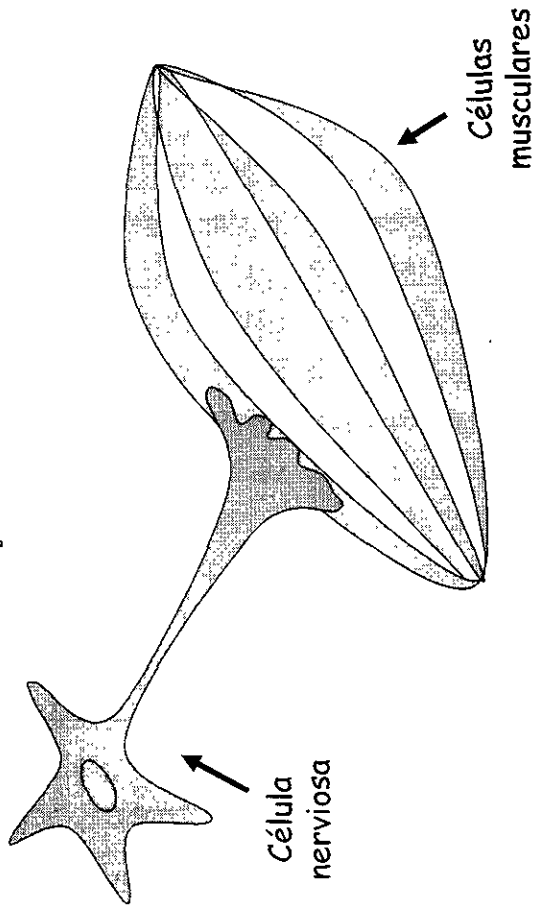
En esta categoría se incluye la comunicación sináptica o neurotransmisión (Fig. 2A), en la que la célula nerviosa (también llamada célula presináptica) que libera el mensajero (neurotransmisor), se encuentra muy cerca de la célula receptora o postsináptica, formando una estructura conocida como sinapsis. El mensajero es liberado al espacio sináptico y se une a receptores presentes en la membrana de otra célula nerviosa, como en el caso de la comunicación entre células del sistema nervioso, o puede unirse a receptores en una célula muscular (placa motora) (Fig. 2B) (Alberts, *et al.*, 1994; García Sáinz, 1996; Voet y Voet, 1992).

C. Comunicación autocrina (Fig. 1C). Las células responden a sustancias que ellas mismas han liberado. Por ejemplo, la interleucina-2, que estimula la proliferación de las células T, mismas que la secretan. También muchos factores de crecimiento actúan de esta forma (Voet y Voet, 1992).

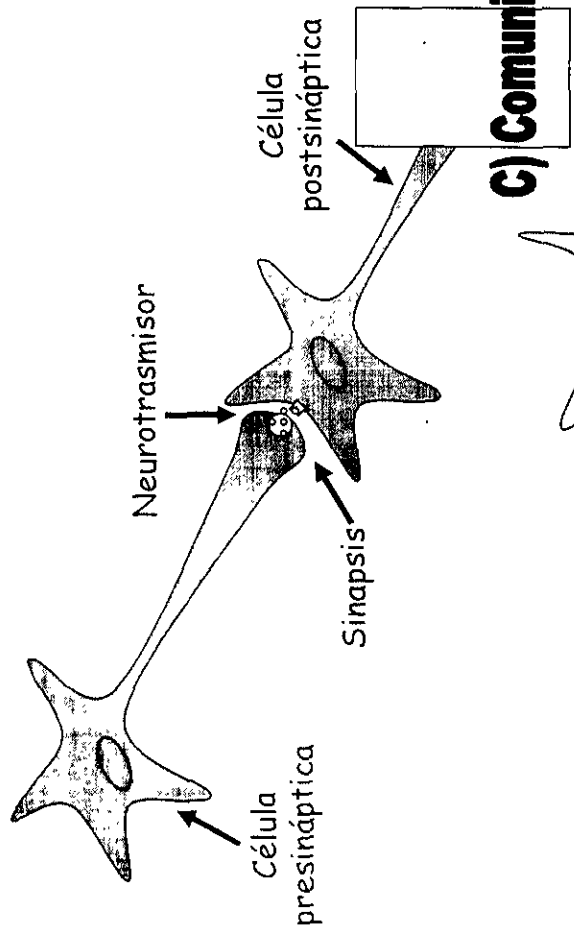
D. Comunicación yuxtacrina (Fig. 1D). Este término fue acuñado por el Doctor Joan Massagué para referirse a la forma de comunicación entre células adyacentes, en la que las moléculas que funcionan como mensajero se encuentran ancladas en la cara externa de la membrana celular. Estas moléculas interactúan con receptores localizados en la membrana de la célula contigua. Ejemplo de este tipo de comunicación es la que ejerce el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) (Wrana, *et al.*, 1994).

Cabe mencionar que esta separación en "tipos de comunicación celular", es puramente conceptual, ya que en la realidad estas formas de comunicación no ocurren como eventos

B) Placa motora



A) Comunicación sináptica



C) Comunicación neuroendocrina

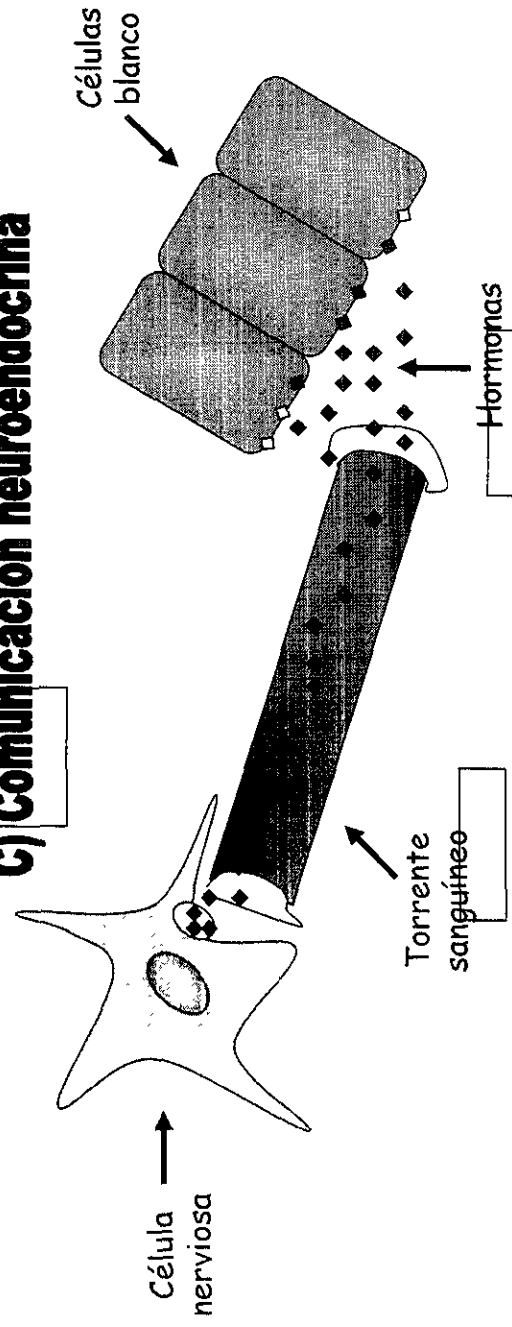


Fig.2 Tres casos especiales de comunicación celular. Dos variantes de comunicación paracrina, en la que células vecinas se comunican entre sí, mediante estructuras especializadas, la sinapsis A) y la placa motora B). Y un caso particular de comunicación endocrina; la comunicación neuroendocrina C), en la que una célula neuronal secreta al mensajero al torrente sanguíneo, el cual actúa sobre células de otros tejidos.

aislados, ni espacial ni temporalmente. De hecho, una misma célula puede estar al mismo tiempo, respondiendo a señales que vienen de células distantes, de células vecinas y mensajes que ella misma secreta.

La respuesta celular depende, entonces, de la unión del mensajero con su receptor específico. Diferentes tipos celulares pueden presentar diferentes subtipos de receptores para un mismo ligando, induciendo cada uno de ellos la misma o diferentes respuestas. Puede ocurrir que el mismo receptor se exprese en varios tipos celulares y sea activado por un mismo ligando, pero induzca una respuesta diferente en cada una de ellas. Más aún, puede ocurrir que la unión de diferentes mensajeros a sus respectivos receptores induzca una misma respuesta en la misma célula. Por esto, la idea de que una hormona está definida para un solo receptor es errónea, lo más frecuente es que existan una variedad de receptores que tengan la capacidad de reconocerla.

Los receptores son proteínas de alto peso molecular, localizados en la membrana plasmática o en el citoplasma, que poseen la facultad de reconocer al mensajero con alta selectividad y una afinidad característica; de esta forma, el complejo ligando-receptor activa un sistema de transducción encargado de amplificar la señal hormonal.

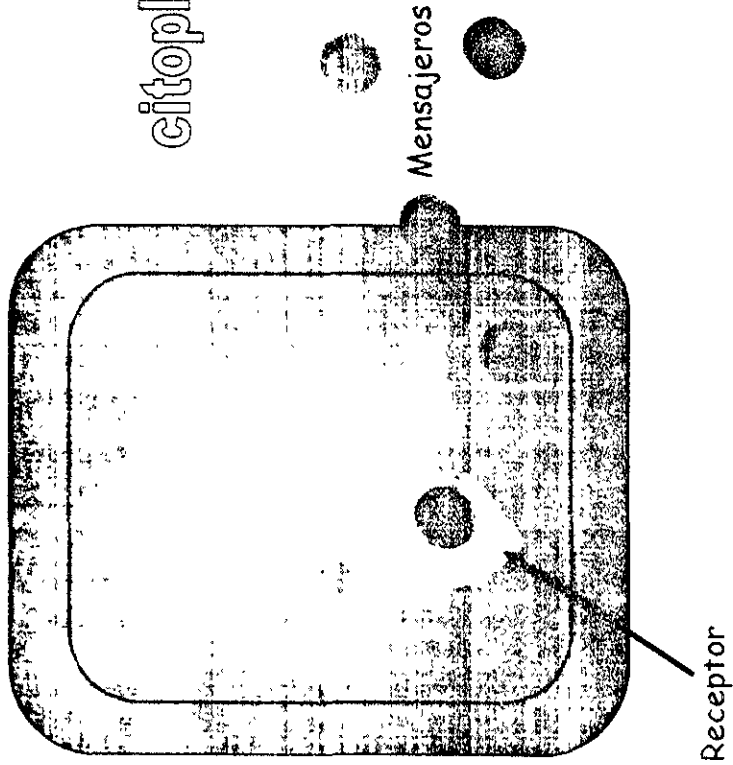
Los receptores además de unir al mensajero natural, pueden unir agentes farmacológicos capaces de bloquear al receptor (**antagonistas**) o bien activarlo (**agonistas**); incluso puede ocurrir que el receptor presente una actividad basal que sea abolida por la unión de un fármaco (**agonista inverso**). Estos agentes pueden diferir del mensajero natural, tanto en afinidad como en actividad intrínseca. Así, con base en el orden de afinidad que tienen los receptores por estos agentes, se hacen las descripciones y clasificaciones farmacológicas de los diferentes receptores (García-Sáinz, 1996; Lenhinger, *et al.*, 1992; Voet y Voet, 1992).

El receptor puede adoptar diferentes conformaciones dependiendo de si se encuentra en estado basal o si se encuentra activado. El receptor puede estabilizarse en una conformación como consecuencia de la unión con los ligandos (agonistas, antagonistas y agonistas inversos) (García Sáinz, 1996).

Por su localización en la célula, los receptores celulares se han clasificado en citoplásmicos y membranales (Fig. 3).

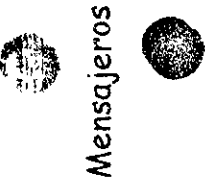
1.2 Receptores citoplásmicos.

Los **receptores citoplásmicos** son proteínas solubles que se pueden encontrar en citoplasma y núcleo. Entre las hormonas que activan a este tipo de receptores se encuentran los receptores para glucocorticoides como la corticosterona y el cortisol, que afectan el

A

citoplásmicos

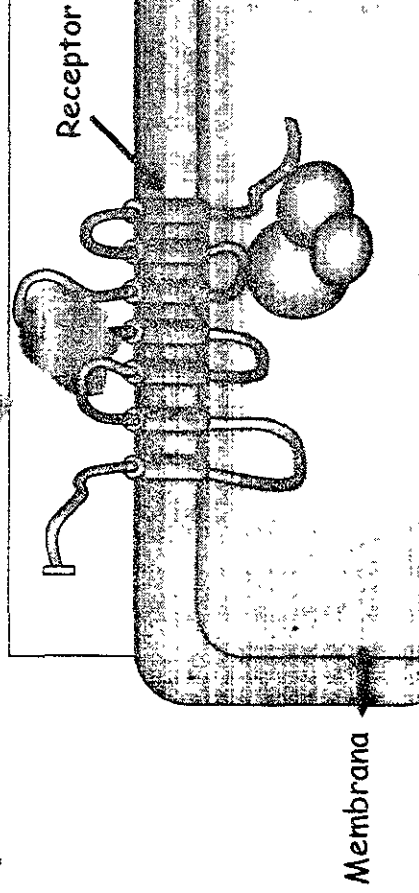
Receptores



Hormonas

Mensajeros

membranales



Membrana

Receptor

B

Fig.3 Receptores celulares. Los receptores citoplásmicos (A), son proteínas solubles que interactúan con mensajeros que difunden a través de la membrana plasmática. Los receptores membranales (B), en cambio, son proteínas integrales de membrana, que tienen una porción extracelular a la que se une el mensajero, una porción transmembranal y una intracelular; esta última interactúa con proteínas que propagan la señal en el interior de la célula.

metabolismos de carbohidratos, proteínas y lípidos; los receptores para mineralocorticoides como la aldosterona que regula la excreción de sal y agua por el riñón; los receptores para hormonas sexuales (andrógenos, progestágenos y estrógenos) como la testosterona, la progesterona y el β -estradiol; los receptores para las hormonas tiroideas y los receptores para la vitamina D. (García-Sáinz, 1996; Lenhinger, *et al.*, 1992; Voet y Voet, 1992)

1.3 Receptores membranales.

Por otra parte, los **receptores membranales** poseen una gran diversidad de estructuras que les permiten activar a diferentes moléculas efectoras que participan en la amplificación de la señal extracelular.

Existen **receptores tipo canal** (Fig. 4A) que son propiamente canales iónicos de membrana, que controlan el paso de iones y participan principalmente en la comunicación entre células nerviosas. Los canales responden a mensajeros llamados neurotransmisores, que al unirse cambian su conformación y se abren o se cierran, permitiendo el flujo de cargas a través de la membrana plasmática. Por lo general, este tipo de receptores está constituido por varias subunidades. El receptor nicotínico para la acetilcolina, que modula la permeabilidad al sodio, así como el receptor de GABA del tipo A, que modula la permeabilidad al cloro, son los receptores tipo canal mejor caracterizados (Alberts, *et al.*, 1994; Changeux, 1993; Sivilotti y Colquhoun 1995; Unwin, 1993).

Existen **receptores membranales con actividad enzimática intrínseca**. Estos se caracterizan por presentar un dominio de unión a la hormona en la región extracelular y un dominio catalítico en el espacio intracelular, mismo que se activa como consecuencia de la unión del ligando. En la mayoría de los casos, la unión del ligando induce la dimerización del receptor. Se han descrito tres diferentes tipos de receptores con actividad enzimática: los que tienen **actividad de cinasa** (Fig. 4B), los que tienen **actividad de fosfatasa** (Fig. 4D) y aquellos que tienen **actividad de guanilato ciclasa** (Fig. 4C)(Alberts, *et al.*, 1994; García-Sáinz, 1996).

La transducción de los **receptores con actividad de cinasa** comienza cuando la hormona activa al receptor incrementando su actividad enzimática y como consecuencia se fosforilan algunos aminoácidos en los dominios citosólicos del propio receptor (autofosforilación). La autofosforilación crea sitios de unión para las proteínas efectoras involucradas en la vía de transducción, como cinasas citoplásmicas o enzimas que generan a los segundos mensajeros. Este tipo de receptores puede ser, dependiendo del aminoácido que

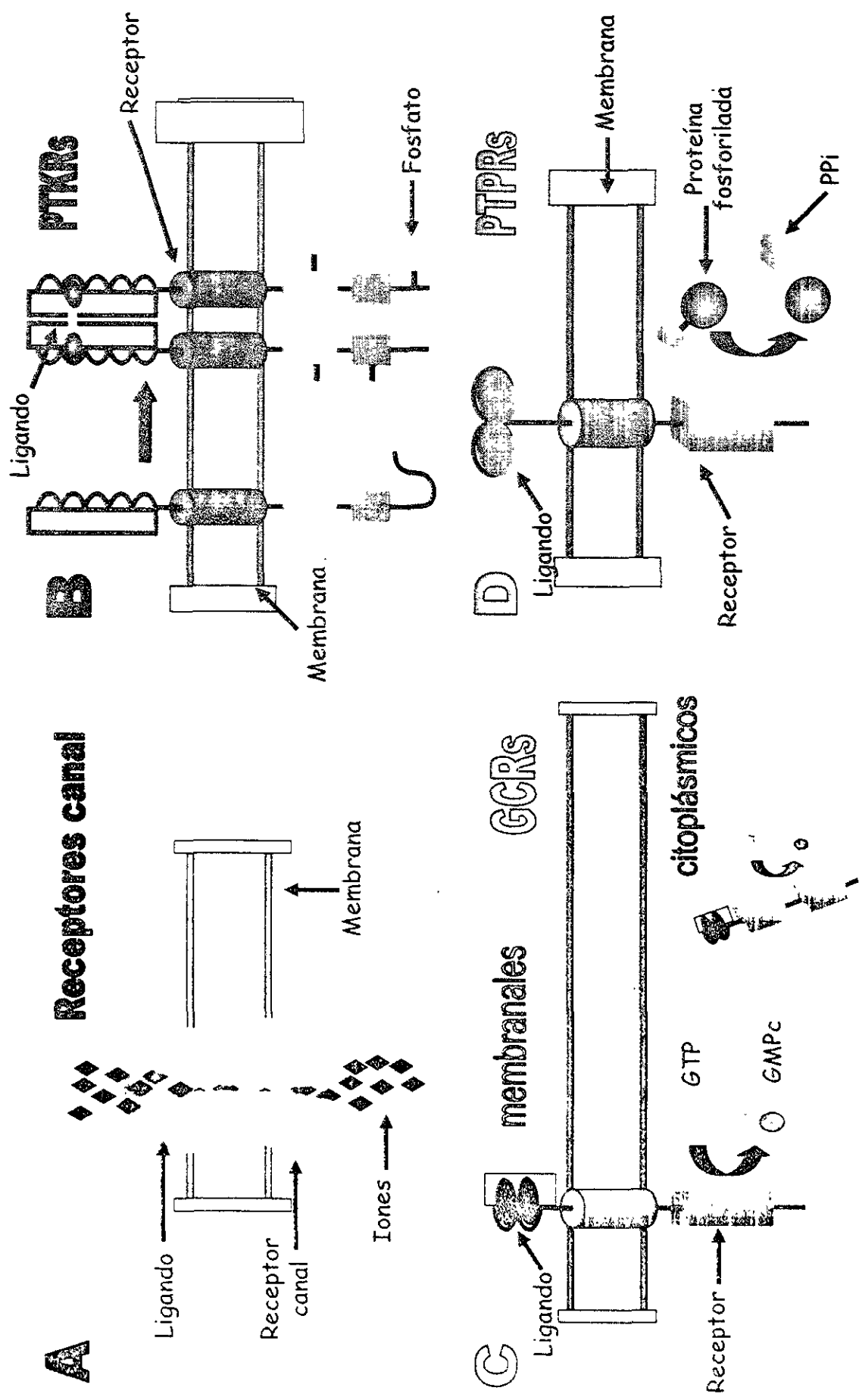


Fig.4 Diferentes tipos de receptores membranales. (A) Existen receptores membranales que son propiamente canales iónicos regulados por el mensajero, su estimulación trae como consecuencia un cambio en el flujo de cargas a través de la membrana. Existen además, receptores membranales con actividad enzimática intrínseca. Esta actividad enzimática puede ser de proteínas cinasas (B), de guanilato ciclasa (C) (existiendo también receptores citoplásmicos con esta actividad), y de proteínas fosfatasa (D).

fosforilen. **receptores tirosina cinasa** si fosforilan tirosinas, o **receptores serina/treonina cinasa** si fosforilan serinas o treoninas (García-Sáinz, 1996).

Entre los receptores capaces de fosforilar proteínas en tirosinas se encuentran los que tienen un dominio transmembranal, como los receptores para los factores de crecimiento, como el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), o el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, platelet derived growth factor); y los receptores con dos dominios transmembranales, como son los receptores para insulina (Alberts, *et al.*, 1994; Schlessinger y Ullrich, 1992; Wilson, 1994). De manera similar, los receptores para el factor de crecimiento transformante beta (TGF β , transforming growth factor- β), también con un dominio transmembranal, catalizan la fosforilación en serinas o treoninas (Massagué, *et al.*, 1994).

Algunos receptores presentan actividad de fosfatasa de tirosina. Los más conocidos están formados por una sola cadena polipeptídica con una gran porción extracelular, una zona transmembranal y una porción intracelular, en donde se localiza la región catalítica. Un ejemplo de este grupo es el antígeno común de los leucocitos, la proteína CD45, una glucoproteína transmembranal presente en las células hematopoyéticas (Charbonneau y Tonks 1992; García-Sáinz, 1996; Hernández-Sotomayor, 1995; Su, *et al.*, 1994).

Entre los receptores con actividad de guanilato ciclasa se encuentran el receptor para el factor natriurético auricular y el receptor para el factor natriurético cerebral. Este tipo de receptores está constituido por una sola cadena polipeptídica, que tiene un dominio extracelular al que se une el factor, un dominio transmembranal y uno intracelular, mismo que contiene el dominio catalítico. Al activarse, el receptor induce la producción de GMP cíclico. El GMPc activa a la proteína cinasa dependiente de GMP cíclico, conocida como PKG, la cual enciende una cascada de fosforilaciones responsables de la mayoría de los efectos fisiológicos de estos factores (Alberts, *et al.*, 1994; García-Sáinz, 1996).

Existen receptores que al no poseer actividad catalítica intrínseca, se asocian a cinasas citosólicas. El ligando induce que los monómeros que conforman al receptor se dimericen y el receptor en forma dimérica interactúa y activa a una o más cinasas citosólicas. Ejemplos de éstos son los receptores formados por dos o más subunidades transmembranales y se expresan básicamente en células del sistema inmune; los receptores para citocinas o interleucinas IL-2, IL-3, IL5 e IL-6; los receptores para el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) y los receptores para interferones como el receptor para el interferón γ (IF γ) (Ziemiecki, *et al.*, 1994).

Si bien éstos receptores son típicamente membranales, por procesos de edición alternativa de los genes se generan algunas formas solubles o no membranales de estos receptores. Así, se llegan a encontrar formas solubles de los receptores para angiotensina II, IL-1, IL-2, IL-4 e IL-6, TNF- α e IF γ (Jans, 1994).

2. Receptores de siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas G (GPCRs).

Existen además, una gran variedad de receptores que involucran en sus acciones a una o más proteínas acopladoras que unen nucleótidos de guanina (proteínas G) (Fig. 5). La interacción proteína G-receptor controla la acción de varios efectores intracelulares. Estos **receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)**, son receptores de siete dominios transmembranales, por lo que se les conoce como receptores serpentina. Estos receptores responden a una gran variedad de hormonas y neurotransmisores, que van desde aminas biogénicas y hormonas peptídicas, hasta hormonas glicoprotéicas.

La vía de señalización de los GPCRs inicia con la unión del agonista a su receptor específico en la membrana celular. Esta unión provoca un cambio conformacional del receptor permitiéndole interactuar con una proteína G heterotrimérica, formando un complejo agonista-receptor-proteína G. La interacción del receptor con la proteína G cataliza el recambio de nucleótidos de guanina (GDP por GTP) en la subunidad α de esta proteína, induciendo la disociación del complejo que conforma a la proteína G en sus subunidades α y el dímero formado por las subunidades $\beta\gamma$. En éste momento se considera que la proteína G está activada. La subunidad α con el GTP unido, activa a la proteína efectora, que puede ser una enzima que genere un segundo mensajero, o un canal iónico de membrana, iniciando así la transducción de la señal. La disociación de la proteína G del receptor reduce la afinidad de éste por el agonista. El complejo $\beta\gamma$ libre también es activo (Alberts, *et al.*, 1994; García-Sáinz, 1996).

La familia de los GPCRs comprende a más de 300 miembros conocidos a nivel de estructura primaria; éstos muestran una similitud estructural considerable a pesar de que existe una gran variedad de agonistas capaces de activar receptores de esta familia. Sus secuencias se caracterizan por presentar siete segmentos hidrofóbicos, de unos 20 a 25 aminoácidos cada uno, que forman α -hélices transmembranales, unidas por tres asas extracelulares y tres asas intracelulares alternadas. La mayor similitud de las secuencias de estos receptores se encuentra en los dominios transmembranales, mientras que las regiones de

GPCRs

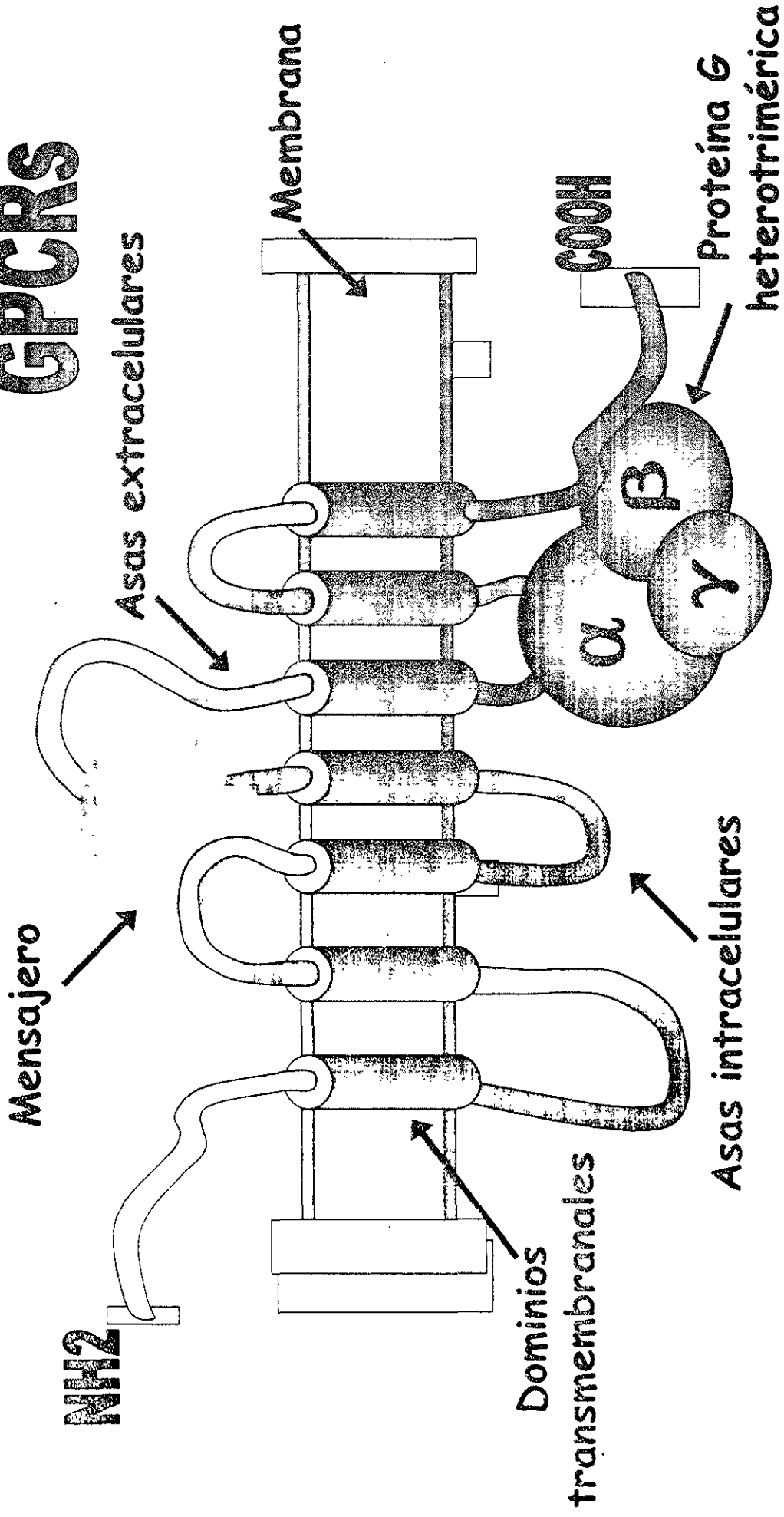


Fig.5 Receptores de siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas G (GPCRs). La unión del mensajero provoca un cambio conformacional en el receptor, permitiéndole interactuar con una o más proteínas acopladoras que unen nucleótidos de guanina (proteínas G). Esta interacción cataliza el recambio de nucleótidos de guanina (GDP por GTP) en la subunidad α de la proteína G, induciendo la disociación del complejo que la conforma, la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$. La subunidad α con el GTP unido, activa a la proteína efectora que puede ser una enzima que genere un segundo mensajero, o puede ser un canal iónico de membrana.

los "loops" o asas se muestran muy divergentes. El análisis de la secuencia de los GPCRs ha permitido clasificarlos en tres subfamilias, (Birnbaumer, 1995; Hausdorff, *et al.*, 1990; Attword. *et al.*, 1991; Schwartz, 1994):

I. rodopsina/ β adrenérgicos (que son los más numerosos)

II. secretina/glucagon o calcitonina/glucagon

III. la subfamilia de los receptores metabotrópicos para glutamato y calcio.

La identidad en la secuencia de los dominios transmembranales en los GPCRs, va de un 85 a un 95% para especies homólogas de un receptor dado, de un 60 a un 80% para subtipos relacionados de un mismo receptor, de un 35 a un 45% para otros miembros de la misma familia, y menor de 20 a 25% para GPCRs no relacionados (Dixon, 1994).

Los GPCRs se presentan como glucoproteínas con patrones heterogéneos de glucosilación. Todos los receptores clonados hasta la fecha, muestran una secuencia consenso para glucosilación, Asn-X-Ser/Thr, la cual forma parte del extremo amino. Sitios consenso de glucosilación también pueden presentarse en la segunda asa extracelular (Dohlman, *et al.*, 1991; Humphrey, *et al.*, 1993; Dixon, 1994)

Se ha observado que algunos receptores como los β_2 -adrenérgicos, el receptor para neurocinina NK1, el receptor para lutropina y el de rodopsina, se encuentran glucosilados cerca del extremo amino en su forma nativa. Sin embargo, la falta de glucosilación de un receptor no parece tener un efecto significativo en la unión del agonista o en la actividad funcional, aunque sí en los niveles de expresión como es el caso de los β_2 -adrenérgicos (Rands, *et al.*, 1990; Kage, *et al.*, 1991; Fong, *et al.*, 1992; Liu, *et al.*, 1993; Dixon, 1994).

Los GPCRs presentan un gran número de sitios conservados de cisteína, algunos de los cuales parecen jugar un papel fundamental en la estructura tridimensional del receptor, ya que la mutación sitio-dirigida de éstos, da como resultado la desensibilización del receptor. En especial, se ha encontrado que muchos GPCRs tienen una cisteína cercana al extremo carboxilo (Cys341) altamente conservada y se ha demostrado que este mismo aminoácido se encuentra palmitoilado en los receptores α - y β -adrenérgicos (O'Dowd, *et al.*, 1989; Kennedy y Limbird 1993) y en el receptor de rodopsina (Papac, *et al.*, 1992). Sin embargo, la función de éste radical palmitoil no es clara. Se ha especulado que esta modificación postraduccional podría anclar una parte citoplásmica del receptor a la membrana, participando en el mantenimiento de la estructura terciaria de ésta región. Para el receptor β_2 -adrenérgico

se ha observado que la sustitución de esta cisteína por una glicina, afecta la capacidad del receptor para activar a la proteína G (O'Dowd, *et al.*, 1989).

También se han detectado secuencias que corresponden a sitios consenso de fosforilación por las proteínas cinasas C y A (PKC Y PKA) en el extremo carboxilo y en la segunda y tercera asas citosólicas. Además se ha demostrado que la fosforilación en el extremo carboxilo tiene un papel muy importante en la desensibilización del receptor (Dixon, 1994).

A la fecha, se han realizado grandes esfuerzos para dilucidar la estructura tridimensional de los GPCRs. Los trabajos comenzaron con el estudio de la bacteriorodopsina, una proteína de siete dominios transmembranales de *Halobacterium halobium*, pero que no se acopla a proteínas G. Mediante un meticuloso análisis de criomicroscopía electrónica de alta resolución y modelaje por computadora, tomando en cuenta las características de los aminoácidos, se logró construir un mapa de densidad electrónica de la bacteriorodopsina. Con base en este análisis se hicieron posteriormente modelos para muchos GPCRs. Sin embargo, se ha encontrado que la bacteriorodopsina presenta diferencias en su secuencia con respecto a la de los GPCRs principalmente en las prolinas que interfieren en la conformación de las α -hélices, y por lo tanto en la conformación tridimensional de los receptores (Henderson, *et al.*, 1990; Dixon, 1994; Schwartz, 1994).

Dos metodologías, la construcción de quimeras formadas por diferentes receptores (Kobilka, *et al.*, 1988) y el cambio de todos los aminoácidos polares capaces de establecer puentes de hidrógeno (Fong, *et al.*, 1993) han permitido grandes avances en la dilucidación de la estructura tridimensional de los GPCRs.

El modelo aceptado de la estructura tridimensional de estos receptores ubica al extremo amino en el exterior de la célula, mientras que el extremo carboxilo se ha localizado en el citosol. En cuanto a los sitios de unión al ligando, se tienen dos teorías, la primera propone que el ligando interactúa con aminoácidos del tercer, quinto y sexto dominios transmembranales (TM-III, TM-V y TM-VI). Mientras que, la hipótesis alternativa propone que el ligando se une a aminoácidos del segundo, tercer y séptimo dominios transmembranales (TM-II, TM-III y TM-VII). Al tercer transmembranal (TM-III) se le ubica en el centro de la estructura de los receptores. Al parecer, tanto la longitud de las asas extracelulares como los aminoácidos que las conforman, determinan la especificidad de unión de los ligandos (Schwartz, 1994).

Los sitios del receptor con los que interactúa la proteína G, se encuentran en el extremo carboxilo y en la segunda y tercera asas intracelulares, los dos primeros se relacionan más con el mantenimiento del estado activado del receptor (Dixon, 1994).

2.1 Proteínas G.

Las **proteínas G** pertenecen a la familia de proteínas con actividad intrínseca de GTPasa. A esta familia pertenecen también las **proteínas G de bajo peso molecular** tales como Ras de 21 kDa, que participa en la vía de señalización de los factores de crecimiento, la proteína Rab que participa en la movilización intracelular de vesículas, en la exocitosis y en la endocitosis; Ran que participa en el transporte de RNA y proteínas a través de la membrana; Rac que controla la actividad de NADPH reductasa en fagocitos; y Rho que interactúa con elementos del citoesqueleto y participa en fenómenos como la formación de filópodos y en el establecimiento de contactos focales (Burgering y Bos, 1995; Denhardt, 1996; Fischer, 1994; Nobes y Hall, 1995).

Los otros miembros de esta familia de GTPasas son las **proteínas G heterotriméricas** constituidas por una subunidad α que es la responsable de la unión e hidrólisis del GTP, y las subunidades β y γ que forman un dímero de alta afinidad.

La duplicación y la divergencia de los genes durante el curso de la evolución han originado una diversidad estructural en cada componente de las proteínas G heterotriméricas. En mamíferos, los polipéptidos que conforman las subunidades de las proteínas G son codificados por varios genes, veinte diferentes genes codifican para la subunidad α , cinco para la subunidad β y doce para la subunidad γ . Las subunidades α tienen un peso molecular que oscila entre los 39 y 52 kDa, el peso molecular de las subunidades β es de 35-37 kDa y el de las subunidades γ esta entre los 6 y 9 kDa. De acuerdo al tipo de subunidad α la proteínas G se han clasificado en cuatro subfamilias, representadas por Gs, Gi, Gq y G12 (Birbaumer, 1992; Hamm y Gilchrist, 1996; Hepler y Gilman, 1992). Los estudios se han centrado en la subunidad α , ya que es la que activa a las proteínas efectoras, a pesar de que, estudios recientes han demostrado que el dímero $\beta\gamma$ también es capaz de activar moléculas efectoras como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y algunos tipos de canales iónicos (Conklin y Bourne 1993; Logothetis, *et al.*, 1987; Okabe, *et al.*, 1990).

Por otra parte, se sabe que un receptor puede interactuar con más de una proteína G y que ésta a su vez, puede modificar la actividad de más de una proteína efectora (Birbaumer, 1992).

Las proteínas G se encuentran en estado inactivo cuando la subunidad α tiene unido GDP. Cuando el primer mensajero llega a la superficie celular y activa al receptor, éste sufre un cambio conformacional que provoca que la proteína G, a su vez, también cambie su conformación. Este cambio provoca que disminuya la afinidad de la subunidad α por el GDP, resultando en la sustitución del GDP por GTP. La subunidad α unida al GTP se disocia del dímero $\beta\gamma$ y ahora es capaz de activar sobre las proteínas efectoras. Luego, cuando la subunidad α hidroliza el GTP a GDP y pirofosfato, el dímero $\beta\gamma$ se une a la subunidad α y se reinicia el ciclo.

Las subunidades α pueden ser activadas también por análogos no hidrolizables tales como el Gpp[NH]p y el GTP γ S; y por el fluoruro de sodio (Birnbaumer, 1990).

Las subunidades α de algunas proteínas G son sustrato de ADP-ribosiltransferasas bacterianas, tales como la toxina del cólera producida por *Vibrio cholerae* que requiere un cofactor protéico para su acción y depende de GTP para su actividad; y la toxina pertussis producida por *Bordetella pertussis* que depende de ATP para su acción. Ambas toxinas tienen como sustrato al nicotín adenín dinucleótido (NAD) y actúan transfiriendo la parte ADP-ribosa del NAD a las subunidades α de las proteínas G. Esta acción bloquea la actividad de GTPasa (hidrólisis de GTP) de las subunidades α , dando como resultado una proteína G constitutivamente activa. La toxina del cólera actúa sobre una arginina de la subunidad α y la toxina pertussis modifica la subunidad α en una cisteína que se encuentra a pocos aminoácidos del extremo carboxilo. Estas toxinas muestran cierta selectividad entre las diferentes proteínas G. La toxina del cólera ADP-ribosila a las proteínas Gs y la toxina pertussis ADP-ribosila a las proteínas Gi/Go; mientras que las proteínas Gq son insensibles a dichas toxinas. Esta selectividad se utiliza como una herramienta bioquímica importante para identificar cual de las diferentes proteínas G es la que participa en determinada vía de transducción (Birnbaumer, 1990; Casey y Gilman 1988).

Las proteínas G pueden también ser modificadas por miristoilación, palmitoilación o ambas (Mumby, *et al.*, 1994; Linder, 1993).

2.2 Vías de transducción.

Las proteínas G funcionan acoplado a los receptores con los efectores. En cuanto a los efectores se han descrito, a la adenilato ciclasa, a la fosfolipasa C, la fosfodiesterasa del GMP, algunas cinasas, la fosfolipasa A2 y algunos tipos de canales iónicos entre otros (Dixon, 1994). En algunos casos se generan segundos mensajeros, por ejemplo, la adenilato

ciclasa genera al AMP cíclico a partir de la hidrólisis del ATP; la fosfolipasa C hidroliza a un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol bifosfato, generando al diacilglicerol y al inositol trifosfato; la guanilato ciclasa genera GMP cíclico a partir del GTP; la fosfolipasa A2 hidroliza fosfolípidos de membrana generando así al ácido araquidónico, un precursor de compuestos biológicamente activos como los eicosanoides, tromboxanos y leucotrienos. Las cinasas fosforilan y activan diversas enzimas; y finalmente los canales iónicos que permiten el flujo de iones a través de la membrana plasmática (Alberts, *et al.*, 1994; García-Sáinz, 1996).

Dos de las vías de transducción mejor caracterizadas, en las que participan receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas, son la vía de la adenilato ciclasa y la vía del recambio de fosfoinosítidos-calcio.

En la **vía de transducción de la adenilato ciclasa (AC)**, participan receptores de siete dominios transmembranales que se pueden acoplar a dos diferentes tipos de proteínas G, Gs y Gi. La subunidad α de la proteína Gs (α_s) activa a la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, mientras que la subunidad α de la proteína Gi (α_i) la inhibe (Fig. 6). Estudios de clonación molecular han revelado la existencia de cuatro diferentes formas de α_s , (dos formas cortas de 380 y 381 aminoácidos y dos largas con 394 y 395 aminoácidos), y tres diferentes subunidades α_i : α_i -1, α_i -2 y α_i -3 (Birbaumer, *et al.*, 1990).

En cuanto a la AC, se han descrito ocho isoformas en mamíferos, ACI, ACII, ACIII, ACIV, ACV, AC VI, ACVII y ACVIII. Sus pesos moleculares están entre los 200 y 250 kDa (Mons, 1998). Estas diferentes formas de la AC pueden ser reguladas positiva o negativamente, por las subunidades α de las proteínas G o por el dímero $\beta\gamma$, por la proteína calcio-calmodulina, y por la forskolina.

La subunidad catalítica de la adenilato ciclasa al ser activada, hidroliza el trifosfato de adenosina (ATP) y forma una molécula de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) y pirofosfato (PPi). El AMPc (que actúa como segundo mensajero) es capaz de activar a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA).

La PKA inactiva, es un tetrámero asimétrico formado por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. La unión del AMPc a la PKA provoca que las subunidades reguladoras pierdan afinidad por las subunidades catalíticas, y se disocian. Como resultado se forman dos dímeros, uno constituido por las subunidades reguladoras-AMPc y el otro por las dos subunidades catalíticas. La PKA activa, fosforila proteínas específicas en aminoácidos de serina y treonina; estas proteínas pueden ser enzimas involucradas en el metabolismo o factores de transcripción.

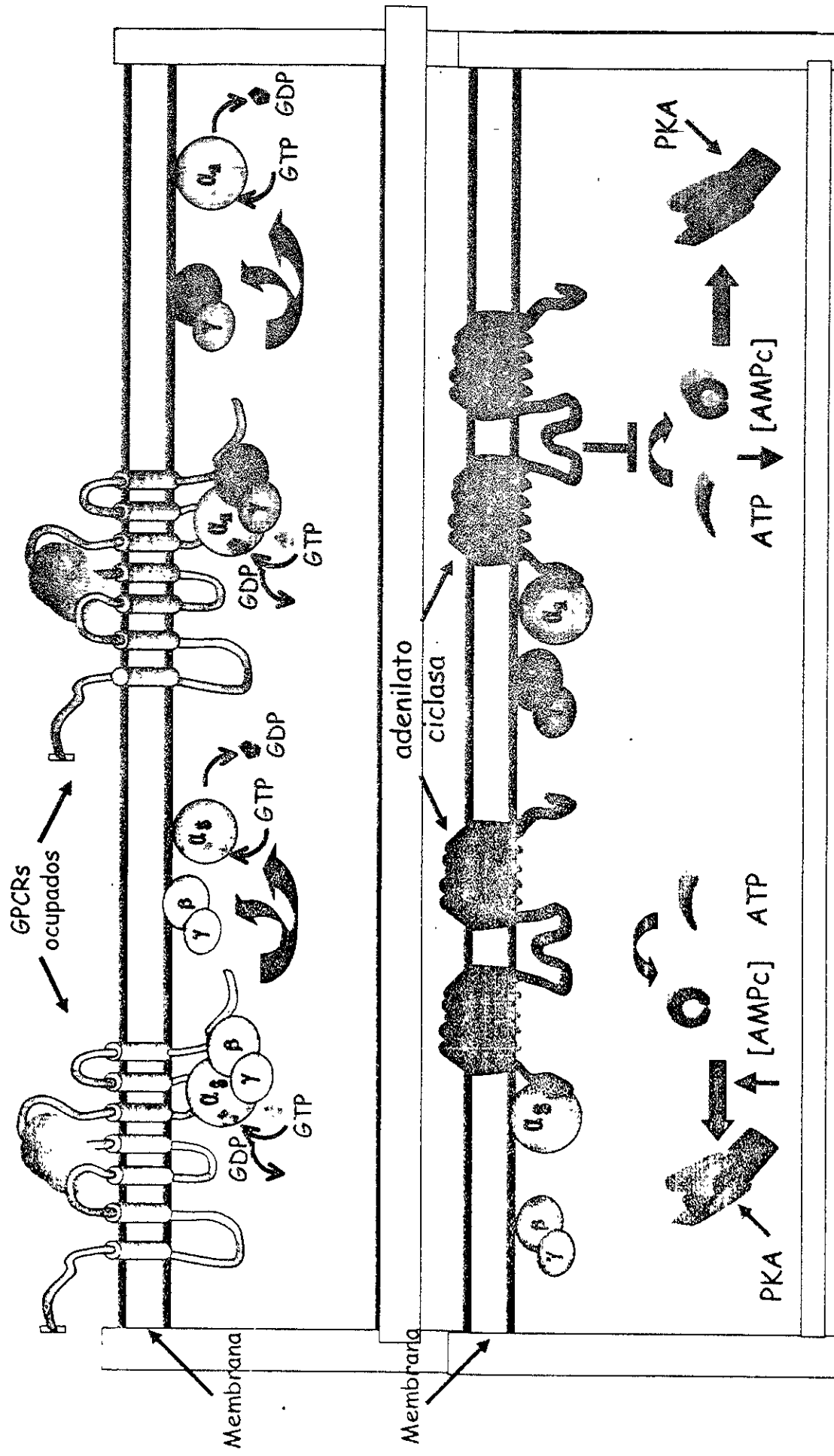


Fig.6 La adenilato ciclasa (AC) hidroliza al trifosfato de adenosina (ATP) y forma una molécula de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc) que actúa como segundo mensajero. Los GPCRs pueden activar a dos diferentes proteínas G que interactúan con la AC. La proteína G_s activa a la subunidad catalítica e la AC, mientras que, la proteína G_o inhibe. El AMPc activa a la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), ésta fosforila en residuos de serina y/o treonina a proteínas específicas que pueden ser enzimas involucradas en el metabolismo o factores de transcripción.

El aumento en los niveles de AMPc citosólico, producto de la AC, es controlado por la acción de la fosfodiesterasa que lo hidroliza y lo hace lineal (Tang y Gilman 1992; Taylor, *et al.* 1990).

Entre los receptores que se encuentran acoplados de forma estimuladora a la vía de la AC están los receptores para vasopresina V1, glucagon y la hormona luteinizante (LH); y entre los que se acoplan de forma inhibitoria se encuentran el receptor para somatostatina y algunos receptores para la acetilcolina.

Puede ocurrir además, que una hormona posea un tipo de receptor que se acople de forma inhibitoria y otro tipo de receptor que lo haga de forma estimuladora, como la epinefrina, hormona capaz de elevar los niveles de AMPc a través de los receptores β 1-, β 2- y β 3-adrenérgicos o de ejercer un efecto inhibitorio disminuyendo los niveles de este segundo mensajero a través de los receptores α 2-adrenérgicos (Lefkowitz y Caron, 1988).

En la vía de transducción del sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio (Fig. 7) los receptores de siete dominios transmembranales se acoplan a una proteína Gq, que activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC es una fosfodiesterasa que utiliza como sustrato un fosfolípido de membrana, el fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato (PIP_2), lo hidroliza y forma, 1, 2-diacilglicerol (DAG) e inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP_3), ambos segundos mensajeros. Como consecuencia de la activación de esta vía se incrementa la actividad de la proteína cinasa C (PKC) y se libera calcio de reservorios intracelulares, principalmente de retículo endoplasmático (Berridge, 1993).

Las proteínas G que participan en este sistema de transducción pertenecen a la subfamilia de las proteínas Gq integrada por: Gq, G11, G14, G15 y G16. Todos los miembros de esta familia interactúan físicamente y activan a la PLC (Berridge, 1993).

Actualmente se conocen tres familias de PLC. La $PLC\beta$ (β 1, β 2 y norpA), $PLC\delta$ (δ 1, δ 2 y δ 3) y la $PLC\gamma$ (γ 1 y γ 2). Hay además evidencias de la existencia de una nueva familia la $PLC\epsilon$, y $PLC\alpha$ de la cual hay controversias sobre su identidad. Todas ellas hidrolizan específicamente al PIP_2 . Sin embargo solo la $PLC\beta$ y norpA son activadas por los receptores de siete dominios transmembranales. Las formas γ se acopla directamente a los receptores que tienen actividad intrínseca de cinasa de tirosina.

La $PLC\beta$ no sólo puede ser activada por la subunidad α de las proteínas Gq, también se ha reportado recambio de fosfoinosítidos al activarse proteínas Gi, que generalmente están acopladas a la vía inhibitoria de la AC. Se piensa que en este caso la activación de la PLC se debe a la participación del dímero $\beta\gamma$, a través de su interacción con una región diferente de la

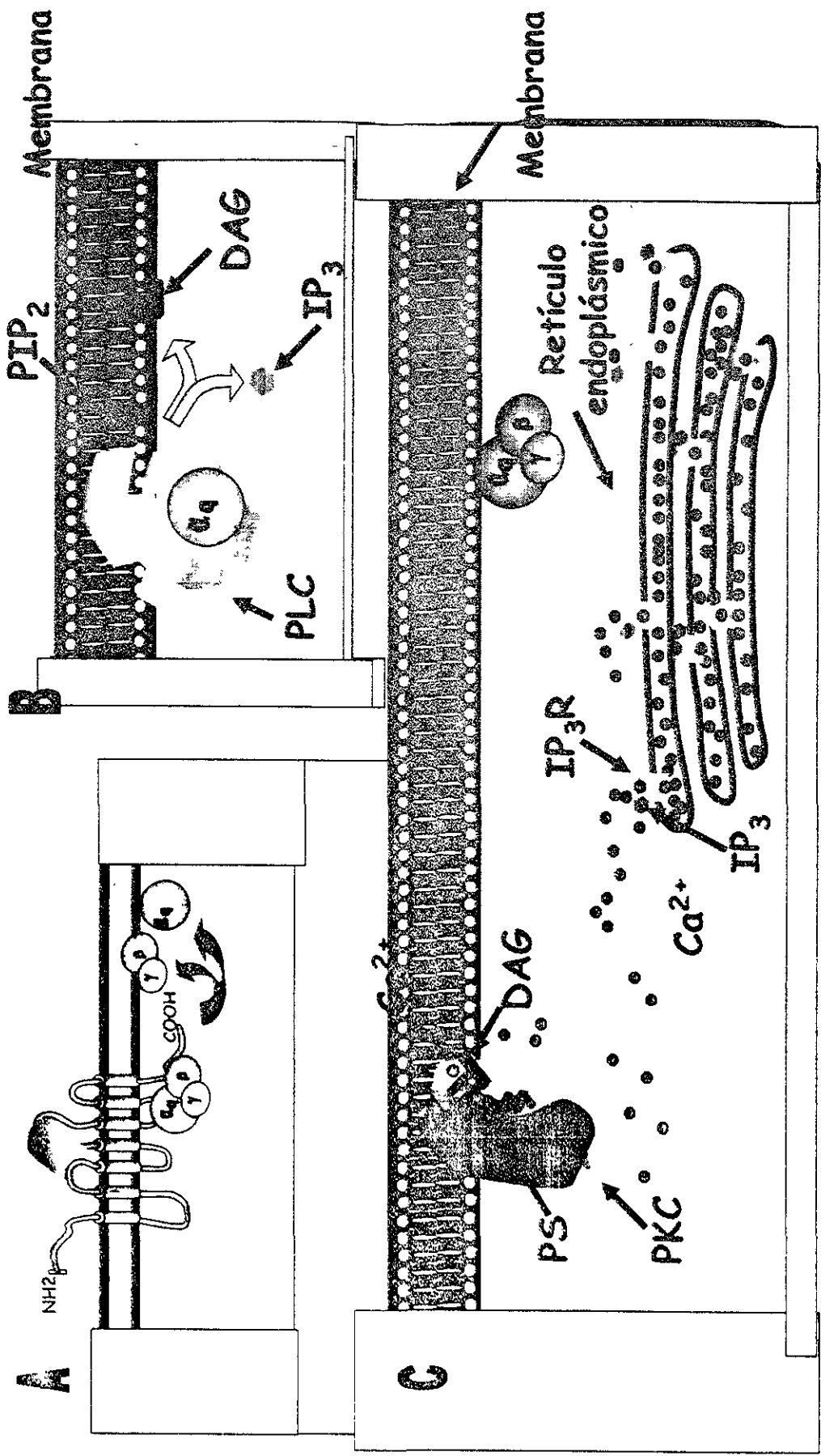


Fig.7 En la vía de transducción del sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio, el receptor se acopla a una proteína Gq (A). La subunidad α de esta proteína (G α q) activa a la fosfolipasa C (PLC). La PLC usa como sustrato al fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato (PIP₂) y lo hidroliza para formar 1, 2-diacil-glicerol (DAG) e inositol-1,4, 5-trifosfato (IP₃) (B). El IP₃ difunde en el citoplasma e interactúa con receptores específicos para él (IP₃R), que se localizan en la superficie del retículo endoplasmático permitiendo la salida de calcio a través de éstos, incrementando la concentración intracelular del catión significativamente. Por otra parte el diacilglicerol (DAG) permanece en membrana donde puede activar directamente a la proteína cinasa (PKC), ésta fosforila proteínas específicas amplificando así la señal (C).

que interactúa α_q . Esta activación por G_i es, a diferencia de la efectuada por G_q , bloqueada por la toxina pertussis (Bong-Leey Ree, 1995; Berridge, 1993; Carozzi, *et al.*, 1993; Exton, 1994).

El IP_3 , por su naturaleza hidrofílica, difunde en el citoplasma e interactúa con receptores específicos tipo canal localizados en la superficie del retículo endoplásmico, permitiendo la salida de Ca^{2+} , por lo que el catión bivalente incrementa de una manera importante su concentración citosólica, que en condiciones normales es del orden de 10^{-6} M, nivel que es mantenido gracias al almacenamiento por mitocondrias y retículo endoplásmico y a la salida de calcio de la célula por bombas de calcio dependientes de ATP (Lenhinger, *et al.*, 1992). La mayoría de los receptores acoplados a la PLC liberan calcio de almacenes intracelulares, pero pueden también promover la entrada de calcio extracelular mediante canales de membrana.

En algunas líneas celulares el IP_3 puede activar directamente canales de calcio específicos en la membrana plasmática. Por ejemplo, la entrada de calcio inducida por IP_3 en linfocitos probablemente esté mediada por un nuevo receptor de membrana para IP_3 (Khan, *et al.*, 1992). De igual forma en la membrana plasmática de células olfatorias se reportó la presencia de canales de calcio sensibles a IP_3 (Fadool y Ache, 1992; Kalinoski, 1992; Restrepo, *et al.*, 1990).

El Ca^{2+} en el citosol actúa como segundo mensajero y activa a un gran número de enzimas, ya sea directamente o a través de proteínas cinasas dependientes de calcio o mediante un complejo calcio-calmodulina.

El aumento de calcio intracelular es rápidamente abatido, gracias a la recaptura por parte del retículo endoplásmico, la salida del ión de la célula mediada por ATPasas de calcio y el secuestro de organelos como las mitocondrias (Berridge, 1993; Clapham, 1995).

El IP_3 puede ser degradado por fosfatasas a mioinositol-1,4-bisfosfato (IP_2), mioinositol-1-fosfato (IP_1) y mioinositol (Berridge, 1993).

Por otra parte el diacilglicerol (DAG) por su naturaleza hidrofóbica permanece en la membrana donde puede activar directamente a la proteína cinasa C (PKC) que es una de las enzimas que participan en la amplificación de la señal.

La PKC tiene una región hidrofóbica que forma parte de la región reguladora, en ella se encuentran los sitios de unión a Ca^{2+} , DAG y para la fosfatidilserina, que actúan como cofactores; tiene además una región hidrofílica en la que se encuentra el dominio catalítico con los sitios de unión al ATP y al sustrato (Jaken, 1996). Los estudios bioquímicos y de

clonación molecular han permitido identificar varias isoformas de la PKC que difieren en el requerimiento de cofactores. Por ejemplo, las isoformas α , βI , βII y γ , que se consideran convencionales, necesitan calcio, fosfatidilserina y DAG para activarse; las isoformas no convencionales, δ , ϵ , η y σ no dependen de calcio para activarse; y las isoformas ζ y λ no necesitan cofactores por lo que se consideran atípicas (Hug y Sarre, 1993; Jaken, 1996)

La PKC es una cinasa que fosforila en serinas y treoninas, que debido a la capacidad que tiene de relocalizarse (se puede traslocar a núcleo o redistribuirse en el citosol y asociarse a la parte interna de la membrana plasmática), puede tener como sustrato a una gran diversidad de proteínas que participan en muy diversos procesos celulares.

Se sabe que la PKC no sólo es activada por el diacil glicerol (DAG) generado vía PLC, sino que también puede ser activada por el DAG producido vía fosfolipasa D (PLD) o por el ácido araquidónico generado vía fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLD genera, a partir de la fosfatidilcolina, ácido fosfatídico que es metabolizado a DAG por la acción de una monofosfoesterasa. La PLA₂ hidroliza fosfolípidos y libera lisofosfolípidos y ácidos grasos. El DAG puede generar ácido araquidónico por la acción DAG lipasa (Hug y Sarre, 1993; Jaken, 1996).

La PKC también puede ser activada por fármacos tales como los ésteres de forbol. Estos compuestos diterpénicos son obtenidos del aceite de las semillas del árbol *Croton tiglium*, y se sabe que son potentes agentes oncogénicos con similitud estructural al DAG. Entre éstos se encuentran el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA o TPA) y el forbol dibutirato (PDBu).

La PKC puede ser inhibida por compuestos que compiten por el sitio de unión del ATP, como la estaurosporina y la sangivamicina.

La PKC tiene un papel muy importante en la vía de transducción, ya que es ella la que se encarga de potenciar la señal hormonal; sin embargo, cabe resaltar que también es capaz de desensibilizar a algunos receptores mediante fosforilaciones en sitios específicos, regulando con esto el sistema de transducción.

Los receptores que se han reportado acoplados a este sistema son entre otros, los receptores para vasopresina, histamina, angiotensina II, serotonina, bradicinina, endotelina, ácido lisofosfatídico, epinefrina (mediante los receptores α_1 -adrenérgicos), los receptores muscarínicos, dopaminérgicos, receptores de la hormona liberadora de gonadotropina y receptores para algunos factores de crecimiento (Berridge, 1993).

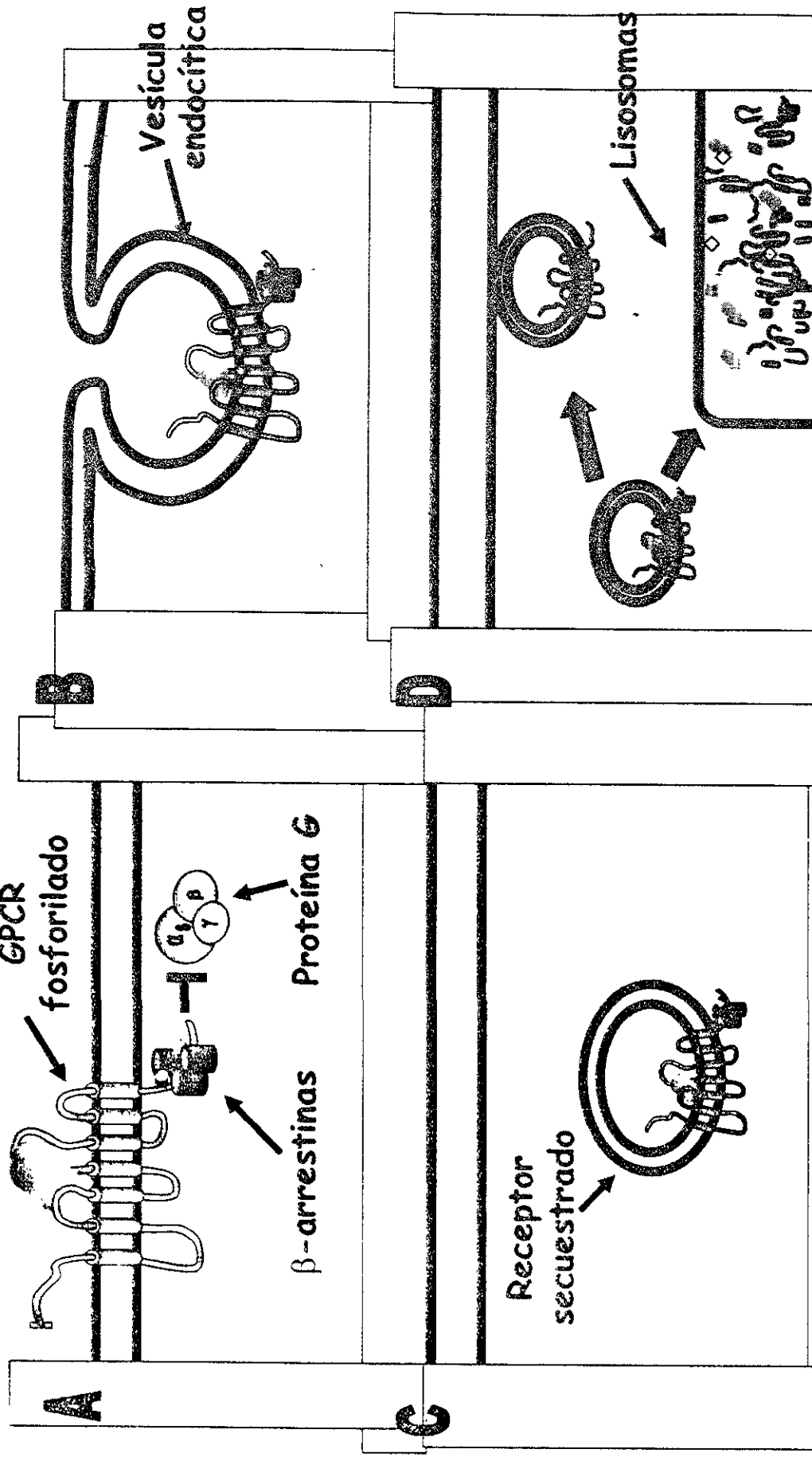


Fig.8 Desensibilización y reciclaje de los GPCRs. Los receptores al ser ocupados por el mensajero pueden ser sustrato de cinasas (puede tratarse de cinasas activadas por segundos mensajeros como PKC y PKA, o de alguna de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G, GRKs). La fosforilación del receptor incrementa la afinidad de éste por proteínas de la familia de las β -arrestinas, que al unirse al receptor impiden su acoplamiento con la proteína G(A) y funcionan como adaptadores para la internalización (secuestro) del receptor (B y C). El receptor puede ser relocalizado en la membrana (ser degradado (D)).

2.3 Regulación y desensibilización.

No está por demás decir que es vital para la célula la eficaz regulación de la transducción de las señales.

La regulación de las respuestas celulares a hormonas puede ocurrir a nivel del receptor por fosforilación como ocurre en la desensibilización. En este caso, el receptor aún en presencia del agonista no es capaz de activar las vías de transducción.

Esto puede ocurrir cuando el ligando se presenta de una forma crónica. Se conoce como **desensibilización homóloga**. La respuesta puede ser disminuida o puede ya no presentarse después de una respuesta aguda ocurrida poco tiempo antes del segundo estímulo. La alteración en la respuesta es específica para la hormona que se ha presentado de forma crónica. Este tipo de desensibilización generalmente se debe a la fosforilación del receptor.

La desensibilización del receptor ocurre cuando el agonista se une al receptor e induce el cambio conformacional que permite la interacción con la proteína G, al mismo tiempo, deja accesibles sitios de posible fosforilación y permite la interacción con cinasas. Puede tratarse tanto de cinasas activadas por segundos mensajeros (PKC y PKA), como de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) (Lefkowitz, 1996).

Las cinasas de los receptores acoplados a proteínas G (GRKs) son una familia de cinasas que fosforilan en serina y treonina al extremo carboxilo de los receptores ocupados por el agonista. Existen seis miembros conocidos de esta familia de cinasas: GRK1 (rodopsina cinasa), GRK2 o β ARK1 (β -adrenergic receptor kinase-1), GRK3 o β ARK2, GRK4 o IT-11, GRK5 y GRK6. Se sabe que un mismo tipo de GRK fosforila a distintos GPCRs (Inglese, *et al.*, 1993; Lefkowitz, 1996; Pitcher, *et al.*, 1998; Premont, *et al.*, 1995).

La fosforilación del receptor incrementa la afinidad de éste por los miembros de una familia de proteínas llamadas β -arrestinas. Estas proteínas se unen al receptor fosforilado de tal forma que impiden el acoplamiento con las proteínas G, y por tanto, la transducción de la señal. Además se ha reportado que las β -arrestinas participan en el proceso de internalización (secuestro) de los receptores funcionando como adaptadores en la endocitosis mediada por clatrina dependiente de dinamina (Fig. 8) (Zhang, *et al.*, 1997; Ferguson, *et al.*, 1998).

Del proceso de resensibilización se piensa que ocurre mediante la activación de una fosfatasa de receptores acoplados a proteínas G (GPCRP) que desfosforila al extremo carboxilo del receptor y revierte la desensibilización (Pitcher, *et al.*, 1995). Esta enzima desfosforila a aquellos GPCRs fosforilados por las GRKs, pero no desfosforila a aquellos que han sido fosforilados por la PKA. Se ha propuesto que para que ocurra el proceso de

resensibilización se requiere que el receptor sea internalizado o por lo menos sea incluido en vesículas endosomales (Yu, *et al.*, 1993; Lefkowitz, 1996).

Las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G podrían estar facilitando la interacción del receptor con cinasas citoplasmáticas como la β ARK1 (Pitcher, 1992; Lefkowitz, 1996).

Puede ocurrir que un receptor no responda al estímulo de su ligando específico después de que la célula responde a un agonista diferente. Este tipo de desensibilización se conoce como **desensibilización heteróloga**. Este fenómeno es parte de lo que se conoce como “**crosstalk**”, que se refiere a la intercomunicación entre las diferentes vías de transducción.

La célula cuenta con un arsenal de moléculas que son capaces de realizar diferentes funciones. Todas estas están interviniendo en diferentes procesos celulares, algunas de ellas tienen una función muy específica y se encuentran localizadas en una región particular de la célula; sin embargo, muchas de estas proteínas y aún aquellas moléculas que están interviniendo en las vías de transducción comparten no sólo el espacio celular, sino también algunas funciones. Por ello, no es difícil entender que estas vías compartan algunas de estas especies moleculares. Puede ser que dos receptores que se encuentren, por ejemplo, acoplados a proteínas $G\alpha_q$ liberen Ca^{2+} de reservorios intracelulares comunes, y sea por esto que, posterior a la respuesta del primer agonista, el segundo no genere ninguna señal.

En general las especies moleculares involucradas en estos fenómenos de intercomunicación son cinasas (PKC, PKA, MAPK y GRKs), fosfatasa y algunos segundos mensajeros (DAG, IP3, Ca^{2+} y AMPc).

Puede ser también que esta intercomunicación no sólo se deba a las moléculas usadas en común. Podría ser un proceso específico de regulación.

Los niveles de receptores funcionales en la membrana son reducidos de manera efectiva por la fosforilación, desensibilización e internalización de los GPCRs. Puede también haber una regulación del número de receptores funcionales disponibles en la membrana plasmática, mediante la internalización o secuestro de los receptores hacia compartimentos intracelulares. Una vez internalizados los receptores pueden ser relocalizados en la membrana o pueden ser degradados proteolíticamente (en compartimentos lisosomales) y sustituidos por receptores nuevos que se generan en el aparato de Golgi (Inglese, *et al.*, 1993; Lefkowitz, 1996; Pitcher, *et al.*, 1998; Premont, *et al.*, 1995).

3. LA BRADICININA

La historia de las cininas empieza en 1909, cuando dos médicos cirujanos franceses, J. E. Abelous y E. Bardier, demostraron que la fracción insoluble en alcohol de la orina humana causa hipotensión cuando es inyectada intravenosamente en un perro anestesiado. Un efecto hipotensor similar de la orina humana fue observado en la presión sanguínea del conejo por Pribram y Hernheiser en 1920.

En 1928 Frey y Kraut atribuyeron este efecto hipotensor a la presencia de una sustancia no dializable, termoestable y de alto peso molecular.

Desde 1936 Eugene Werle y sus colaboradores estudiaron extensivamente este material biológico activo y en una serie de publicaciones demostraron su presencia en sangre, páncreas y glándulas salivales. Ellos asumieron que el factor hipotensor en la orina, se originaba en el páncreas y por la derivación del griego *kallikreas* de páncreas, lo nombraron kalikreina. También encontraron que la kalikreina era prácticamente inactiva sobre el intestino aislado de cuyo, pero incubando la kalikreina con sangre, causa un incremento considerable en su actividad. En 1948 reportaron a la kalikreina como una enzima que al reaccionar con la sangre liberaba una pequeña molécula, responsable de los efectos biológicos, a la que llamaron kalidina y a su precursor kalidinógeno (Boola, *et al.*, 1992).

En 1949 M. Rocha e Silva, W. T. Beraldo y G. Rosenfeld, del departamento de Bioquímica y Farmacodinámica del Instituto Biológico de São Paulo, Brasil, estudiando los efectos fisiológicos del veneno de una especie de serpiente, *Bothrops jararaca*, encontraron que algunas muestras de sangre de perro tomadas después de inyectar dosis mínimas del veneno presentaban un efecto hipotensor fuerte, además de inducir contracciones lentas en preparaciones de músculo liso de intestino aislado de cuyo.

Observaron que estos efectos no se presentaban cuando se aplicaba el veneno directamente y que eran reproducibles cuando se usaba tripsina en lugar del veneno de serpiente. Notaron que no ocurría una desensibilización inducida por dosis repetidas del agente y vieron que el agente estimulante desaparecía de la muestra sanguínea rápidamente después de la inyección del veneno, por lo que pensaron que este agente era destruido por acción enzimática secundaria del mismo veneno (ya que este efecto era dependiente de la temperatura) lo que además sugería que el agente tenía una naturaleza polipeptídica o una estructura unida a péptidos.

Al principio estimulante le llamaron bradicinina un término también derivado del griego: *bradys*, que significa lento, y *kinein*, que se refiere a movimiento. Determinaron que se produce a partir de una fracción de globulinas (que se precipitaban con solución saturada al

30 o 45% de sulfato de amonio) a las que nombraron bradikinógenos, (hoy se sabe que son las globulinas α_2 , sintetizadas por el hígado y que circulan en el plasma). Como características adicionales reportaron que era termoestable, dializable a través de celofán, y resistente a la ebullición prolongada en solución de HCl, pero que era rápidamente destruida si se calentaba en solución alcalina.

En 1960 el nonapéptido bradiginina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) fue aislado por el grupo de Elliott, y sintetizado por Boissonnas y asociados. Poco después, se encontró que la kalidina era un decapeptido, una bradiginina con una lisina adicional en el amino terminal. Ahora se conoce que estas dos sustancias forman parte de un grupo de polipéptidos con estructuras químicas relacionadas y propiedades farmacológicas particulares, que se han nombrado genéricamente cininas. Las cininas se generan a partir de precursores llamados kininógenos mediante la acción enzimática de las kalikreinas y son metabolizados por las cininasas.

En 1980, Regoli y Barabé clasificaron a los receptores para bradiginina en dos subtipos, B1 y B2, mediante el uso de antagonistas selectivos. El desarrollo de la primera generación de antagonistas para estos receptores ocurrió a mediados de los ochentas; en éstos antagonistas la prolina en la posición 7 fue sustituido por una fenilalanina y se hicieron modificaciones para incrementar la afinidad y bloquear la acción enzimática que causaba la degradación de los péptidos. La segunda generación de antagonistas de cininas se desarrolló a principios de los 90's. En estos nuevos compuestos los aminoácidos en las posiciones 7 y 8 fueron remplazados por aminoácidos hidrofóbicos para darles mayor potencia y hacerlos más duraderos (Stewart, 1995). Los antagonistas han permitido incrementar importantemente el conocimiento de las acciones de las cininas.

Cininas

Las cininas, como la bradiginina, se consideran hormonas de acción local. Son péptidos vasoactivos, que influyen en numerosos procesos biológicos. Se ha establecido que pueden ser agentes hipotensores, pueden incrementar la permeabilidad vascular, son potentes autacoides mediadores del dolor, inducen la contracción del músculo liso del tracto respiratorio, del intestino y del útero, e incrementan la movilidad de los espermatozoides. Son sintetizadas *de novo* en los sitios donde ha ocurrido daño tisular. Participan en la respuesta inflamatoria aguda en la microvasculatura y ayudan en la reparación del tejido (Hall, 1997).

A nivel celular, las cininas promueven el transporte de glucosa y cloro, liberan neurotransmisores, activan a la fosfolipasa A_2 y estimulan a los osteoclastos (Hall, 1997).

Cininasas

Kalikeinas tisulares

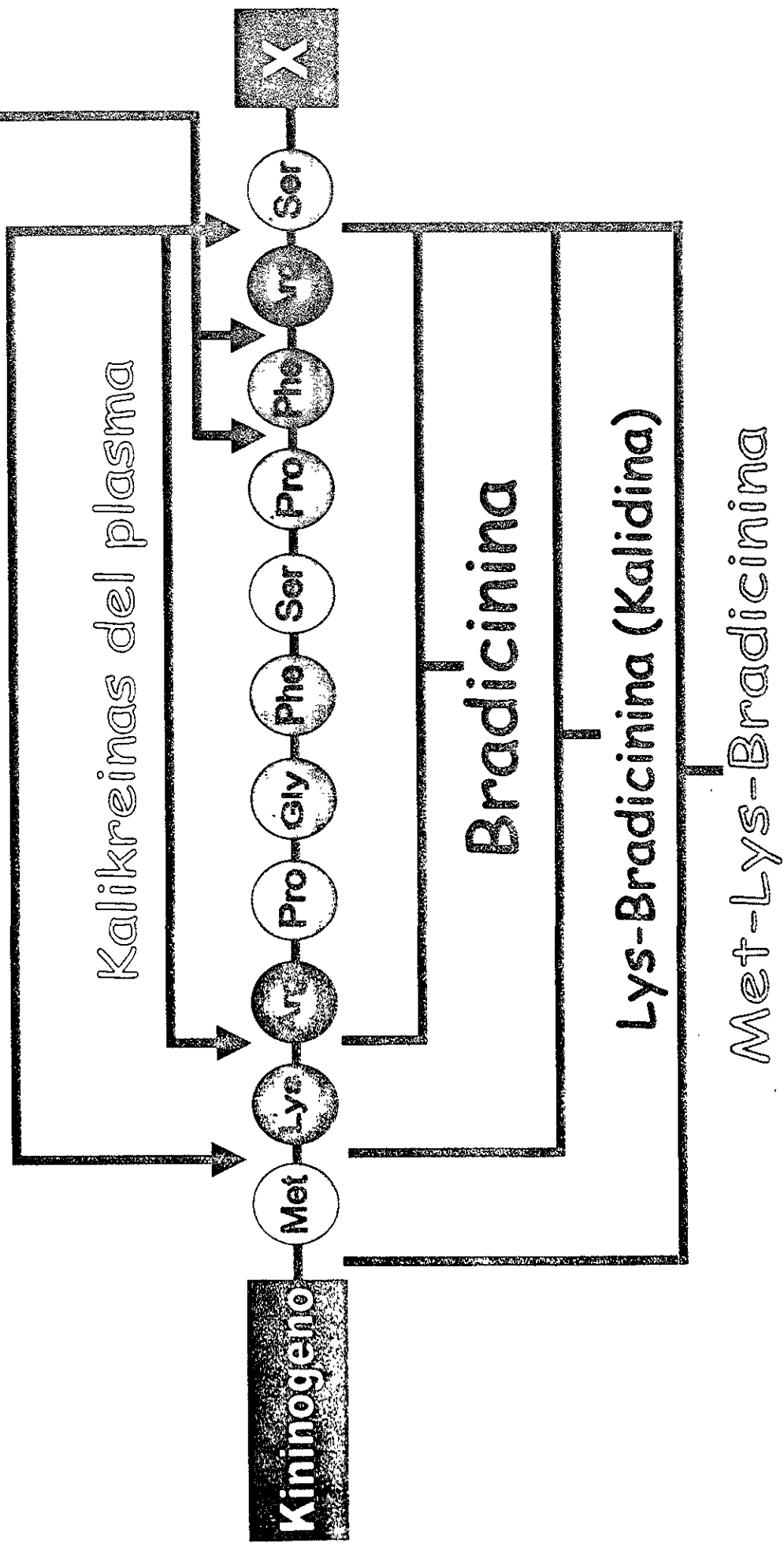


Fig. 9 Estructura primaria de las cininas y sitios de corte enzimático. Las cininas se forman por la acción enzimática de las kalikeinas del plasma y tisulares sobre los kininógenos, y son inactivadas proteolíticamente por las cininasas.

Kalikreinas

Las kalikreinas son un grupo de proteasas de serina que se encuentran en células glandulares, neutrófilos y fluidos biológicos, que están involucradas en los procesos post-traduccionales de polipéptidos. Por lo general, se encuentran en estado inactivo en forma de prekalikreinas y requieren de otras proteasas para activarse.

Las kalikreinas se dividen en dos grupos, las kalikreinas del plasma y las tisulares (o glandulares); las primeras se expresan únicamente en el hígado y son codificadas por un solo gen a diferencia de las kalikreinas del tejido, las cuales son codificadas por varios genes y se expresan en una gran variedad de células (Clemens, 1994). Los dos tipos difieren en su peso molecular, en su punto isoelectrico (pI), especificidad por el sustrato, características inmunológicas, tipo de cininas que liberan. Las prekalikreinas plasmáticas se almacenan en páncreas, intestino y riñón, de donde son secretadas. Ya en circulación son activadas por el factor de coagulación XII o factor Hageman. Las prekalikreinas tisulares actúan muy cerca de donde se sintetizan, esto es, en glándulas salivales, sistema nervioso central y sistema cardiovascular (Goodman & Guilman, 1996).

El sistema kalikreinas-cininas en plasma se considera un anticoagulante constitutivo que protege al endotelio (Linz, *et al.*, 1995), mientras que el del tejido es un factor esencial en la reacción tisular a estímulos nocivos y en la reparación tisular (Regoli y Barabé, 1980).

Las kalikreinas liberan péptidos vasoactivos, las cininas, mediante acción enzimática, a partir de sustratos endógenos llamados kininógenos (Fig. 9)(Müller-Esterl, *et al.*, 1986). Las enzimas que poseen la capacidad de liberar cininas a partir de kininógenos son llamadas kininogenasas. Este nombre genérico incluye enzimas como las kalikreinas de tejido y plasma, la tripsina, la plasmina y las proteasas del veneno de la serpiente *B. jararaca* (Bhoola, 1992).

Kininógenos

En mamíferos se han descrito dos tipos principales de kininógenos, los de alto peso molecular del plasma (HMWK) y los kininógenos de bajo peso molecular del tejido (LMWK), los cuales derivan de un mismo gen hepático el cual, por corte y empalme diferencial, produce dos RNAs mensajeros que difieren en tamaño (3.5 y 1.7kd) y función (Regoli, *et al.*, 1998). Además ha sido descrita una proteína llamada T-kininógeno que se ha detectado sólo en rata (Okamoto y Greenbaun, 1983). Los kininógenos se encuentran en una concentración alta en sangre (4 a 12 mg/ml) y al ser cortados elevan rápidamente los niveles

de cininas que normalmente se encuentran a concentraciones de pg/ ml. Durante los procesos inflamatorios subcutáneos la bradicinina alcanza concentraciones de ng/ ml.

Los HMWK son precursores de la bradicinina mientras que los LMWK lo son de la kalidina (Lys-bradicinina) ambas son transformadas después (por una carboxipeptidasa M y N) en fragmentos (desArg⁹-bradicinina y Lys-desArg⁹-bradicinina) los cuales desarrollan actividades biológicas específicas (Regoli y Barabé, 1980).

Cininasas

Las diferentes cininas son inactivadas por peptidasas llamadas cininasas que se encuentran en sangre y tejido. Son rápidamente degradadas *in vivo* por peptidasas tales como la enzima convertidora de angiotensina (ACE o cininasa II), carboxipeptidasa N (cininasa I o KI) y aminopeptidasa P, las cuales cortan e inactivan a los péptidos. Se han establecido dos grandes grupos de proteasas que inactivan cininas, son las cininasas I y II (KI y KII). La familia KI incluye KI-CPN del plasma y la enzima de membrana, KI-CPM ambas remueven la Arg⁹ de las moléculas de cinina. Las enzimas del grupo KII, KII-ACE y KII-NEP liberan el dipéptido Phe⁸- Arg⁹. La KII-ACE además degrada el extremo carboxilo mediante el anclaje del dipéptido Ser⁶-Pro⁷. La vida media de la bradicinina en el plasma es menor a los 15 seg, en tanto que la de la kalidina es de 9 seg (Erdős, 1990).

3.1 Procesos fisiológicos en los que interviene la bradicinina.

Los receptores para bradicinina median la mayoría de las acciones documentadas para las cininas endógenas y la mayoría de las funciones biológicas. Estas incluyen contracción o relajación del tono del músculo liso de los tractos intestinal, urogenital y respiratorio; efectos sobre endotelios, induciendo la liberación de óxido nítrico, prostaglandinas y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio, y también en la regulación del transporte de iones (Regoli y Barabé, 1980; Toda, *et al.*, 1987; Schini, *et al.*, 1990; Mombouli y Vanhoutte, 1995).

Posiblemente desarrollan un papel transmisor en el sistema nervioso central al inducir la liberación de neurotransmisores y un papel emergente como modulador en la proliferación celular incluyendo tanto efectos mitogénicos, como antimitogénicos (Schini, *et al.*, 1990; Mombouli y Vanhoutte, 1995).

También influyen en la circulación periférica, donde inducen vasodilatación e incremento en el flujo sanguíneo (reduciendo el tono del músculo liso de las arterias). Pueden provocar formación de edema, así como, dolor e hiperalgesia vía estimulación de fibras C y

A. extravasación mediante la contracción de los capilares endoteliales (Regoli y Barabé, 1980) y constricción de las venas a través de la estimulación de las fibras del músculo liso (Gaudreau, *et al.*, 1981).

La bradicinina estimula la liberación de óxido nítrico, agente vasodilatador, en células de los vasos cuando ocurre daño celular. Además es capaz de liberar catecolaminas de la médula suprarrenal ejerciendo efectos quimiotácticos y estimulantes en macrófagos y neutrófilos, y provocando la desgranulación de células cebadas (Dray y Perkins, 1993).

Por mucho, la mejor conocida y más extensivamente caracterizada función de las cininas concierne a su acción inflamatoria. Las cininas son potentes agentes vasoactivos en la microcirculación, donde realizan acciones sobre la musculatura lisa de la microvasculatura y células endoteliales, promoviendo la vasodilatación arterial y la extravasación del plasma seguido de alteraciones de tipo inflamatorio o daño tisular. Estos efectos son generalmente mediados vía estimulación de los receptores B2.

Además, mediante la estimulación directa de terminaciones nerviosas, las cininas activan vías de dolor y promueven inflamación neurogénica vía liberación periférica de sustancias proinflamatorias como la sustancia P, la neurokinina A y de un péptido relacionado con el gen de la calcitonina (calcitonin gene-related peptide) (Steranka, *et al.*, 1988; Hall, 1997).

Se sabe que las cininas participan en enfermedades inflamatorias (Dray y Perkins, 1993), enfermedades cardiovasculares, desórdenes en el tracto urinario, desórdenes en el tracto respiratorio, incluyendo rinitis y asma (Barnes, 1992), alergia (Polosa, 1993), artritis, sepsis (inflamación séptica), rinitis viral, enfermedades inflamatorias intestinales, pancreatitis, (Farmer y Burch, 1992) y después de traumas y lesiones (Rodell, 1996), las cininas promueven la migración de células de la sangre al tejido y activan varios componentes tisulares como los mastocitos, fibroblastos y macrófagos (Bhoola, *et al.*, 1992). Actúan además sobre músculo liso en casi todos los órganos y en sistema nervioso autónomo simpático (Tousignant, *et al.*, 1987) y parasimpático (Lopes y Couture, 1992) así como nervios sensoriales (Steranka, *et al.*, 1988; Geppetti, 1993), y participan en el dolor e hiperalgesia que acompañan a las alteraciones de tipo inflamatorio (Stewart, 1995).

Estos numerosos efectos son el resultado de la activación de dos tipos de receptores, el receptor B2 el cual se expresa de forma constitutiva (Regoli y Barabé, 1980) y se expresa en muchos tipos celulares, y el receptor B1, el cual es inducible y se produce *de novo* en varios tipos celulares por estímulos que activen el sistema de citocininas, particularmente el sistema

de la interleucina 1β (Regoli, *et al.*, 1981; Deblois, *et al.*, 1989; Marceau, 19951). Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR).

3.2 Tipos de receptores a bradicinina.

El **receptor B1** fue originalmente descrito en preparaciones de aorta de conejo y posteriormente en preparaciones de tejido cardiovascular, sistema urinario e intestinal y en células en cultivo de origen vascular, endotelial, mesangial, traqueal, óseo y en fibroblastos. Se sabe que está involucrado en numerosas condiciones inflamatorias, incluyendo ciertas formas de hiperalgesia persistente, además de que este tipo de receptor, es sintetizado *de novo* en sitios donde ha ocurrido daño tisular o inflamación. La síntesis del receptor B1 se piensa que involucra la producción endógena de citocinas, y se ha demostrado tanto en tejido vascular como en tejido no vascular.

El **receptor B2** se ha identificado en numerosas preparaciones *in vitro*, incluyendo tejido intestinal, neuronal, cardiovascular, tracto genitourinario y respiratorio. La mayoría de los efectos *in vivo* de las cininas que se han atribuido a la activación de éste tipo de receptor, incluyen la broncoconstricción, la hipotensión, reacciones inflamatorias agudas e hiperalgesia (Hall, 1997).

La mayoría de los estudios de asociación de ligandos radiactivos con los receptores, reportan un sólo sitio de unión para la bradicinina. sin embargo, hay reportes de dos o tres sitios que podrían representar múltiples subtipos del receptor B2 (B2A y B2B) o diferentes estados de afinidad del mismo receptor (Murone, *et al.*, 1996).

Hay evidencia aportada por Farmer y colaboradores, de un subtipo B3 de receptor para bradicinina. Ellos reportaron que varios agonistas selectivos B1 y B2, presentaban muy poca afinidad por el receptor de bradicinina que se expresa en células de pulmón de cuyo (Farmer y Burch, 1989); sin embargo estudios subsecuentes hechos por este mismo y otros grupos de trabajo han encontrado resultados conflictivos y no se ha concluido claramente si efectivamente existe el receptor B3. No se ha clonado el gen para el receptor de bradicinina en cuyo, además podría tratarse de un proceso de corte y empalme alternativo del gen que codifica para diferentes subtipos de receptores.

Los agonistas para el receptor B1 fueron sintetizados casi diez años antes que los agonistas para el receptor B2 de bradicinina. El primer antagonista sintetizado fue la [Leu⁸]des-Arg⁹-bradicinina, el cual se obtuvo remplazando la fenilalanina (Phe⁸) del extremo carboxilo por una leucina, esta sustitución no hacía decrecer la afinidad por el péptido pero

abolía completamente su actividad biológica. La aromaticidad de este aminoácido es indispensable para la activación del receptor, en tanto que, los otros siete lo son para llevar a cabo la unión al receptor. Los antagonistas selectivos B₁ más usados son [Leu⁸]des-Arg⁹-bradicinina y Lys-[Leu⁸]des-Arg⁹-bradicinina, debido a que no interactúan con el receptor B₂ (Regoli, *et al.*, 1998).

3.3 Genética de los receptores de bradicinina.

Ha sido demostrado que los dos subtipos de receptores para bradicinina, B₁ y B₂, son codificados por dos distintos mRNAs. El receptor B₁ es codificado por un mRNA aproximadamente 2kb más corto que el que codifica para el B₂ (Webb, *et al.*, 1994; Brown, *et al.*, 1995)

El gen que codifica para el receptor B₁ ha sido clonado de conejo (MacNeil, *et al.*, 1995), humano (Menke, *et al.*, 1994; Kammer, *et al.*, 1995) y de ratón (McIntyre, *et al.*, 1993). El receptor clonado de humano codifica para una secuencia de 353 aminoácidos y muestra un 36% de homología con la secuencia aminoacídica del receptor B₂ (Menke, *et al.*, 1994), además presenta los siete dominios transmembranales característicos de los GPCRs.

El gen que codifica para el receptor B₂ ha sido clonado de rata, (McEchern, *et al.*, 1991), conejo (Bachvarov, *et al.*, 1995), humano y ratón. (Hess, *et al.*, 1992; Ma, *et al.*, 1994). Los receptores B₂ de rata y ratón poseen una secuencia de 366 aminoácidos, mientras que el de humano tiene 364 aminoácidos y tiene una homología del 80% con los de rata y ratón.

3.4 Estructura del receptor B₂ de bradicinina

El receptor de bradicinina, como todos los GPCRs, tiene un extremo amino (N) extracelular nombrado dominio extracelular 1 (EC-I), un extremo carboxilo (C) intracelular nombrado dominio intracelular 4 (IC-IV), y siete dominios transmembranales altamente conservados, denominados (TM-I-VII), conectados por tres asas intracelulares (IC-I-III) y tres asas extracelulares (EC-I-III) alternadas (Fig. 10).

Este receptor consta de 364 aminoácidos y pesa 42 kDa. Presenta un enlace disulfuro (Cys¹⁰³-Cys¹⁸⁷), sitios putativos de fosforilación por PKA (Ser³¹⁶) y por PKC (Thr¹⁷⁰, Thr²³⁷ y Thr³⁴²) y sitios de glucosilación (Asn³, Asn¹² y Asn¹⁸⁰). El receptor glucosilado pesa de 78 a 81 kDa (Yaqoob, *et al.*, 1995).

En el receptor B₂, la mutagénesis sitio dirigida y la construcción de proteínas quiméricas de los receptores, han mostrado que la unión de la bradicinina es dependiente de dos aminoácidos de ácido aspártico, Asp²⁶⁸ y Asp²⁸⁶, en el dominio EC-IV (Novotny, *et al.*,

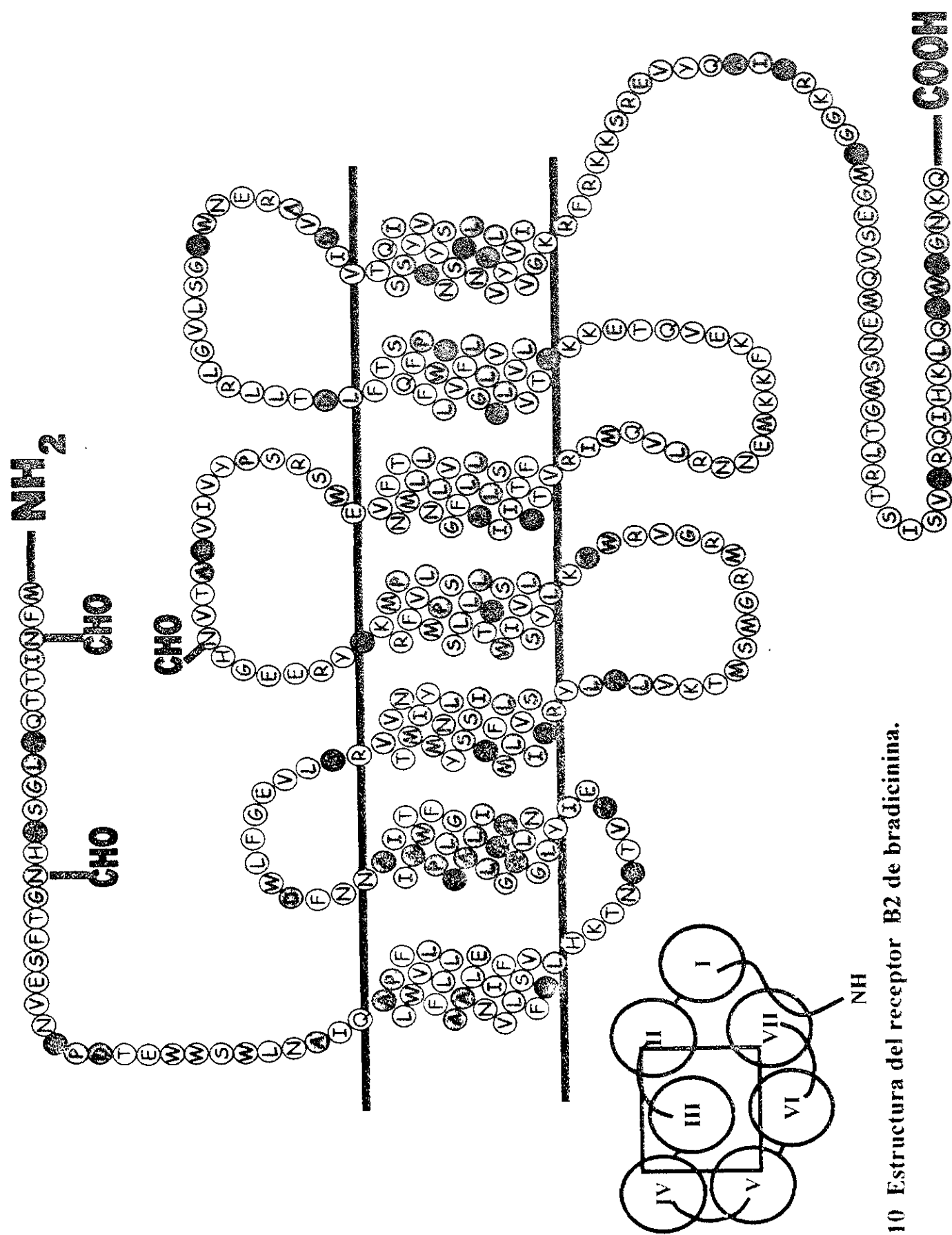


Fig. 10 Estructura del receptor B2 de bradicinina.

1994), los cuales, se piensa que, interactúan electrostáticamente con el grupo amino de la bradicinina o a la cadena lateral de la Arg¹ (Kyle, 1995). El papel desempeñado por los aminoácidos extracelulares con carga en la unión de la bradicinina con el receptor B2 no es de sorprenderse, considerando la naturaleza hidrofílica del péptido.

La unión de bradicinina también requiere de los aminoácidos Phe²⁵⁹ y Thr²⁶³ localizados abajo del Asp²⁶⁸ en el dominio TM-VI (Nardone y Hogan, 1994). En el receptor B2 humano se ha demostrado que la Cys¹⁰³ en el EC-II y la Cys¹⁸⁴ en el EC-III son esenciales para la formación de sitios de unión con alta afinidad por el ligando, mientras que la Cys²⁰ en el EC-I y la Cys²⁷⁷ en el EC-IV no lo son. El extremo amino de la bradicinina cuando se une al receptor B2 queda adyacente a la Cys²⁷⁷ en EC-IV y a la Cys²⁰ en el EC-I del receptor (Herzig, *et al.*, 1996). Además, se ha reportado que anticuerpos dirigidos específicamente contra la mitad del extremo carboxilo del EC-IV del B2 humano interfieren con la unión de la bradicinina (Add Alla, *et al.*, 1996). Así, es posible que aminoácidos en EC-IV y en el TM-VI adyacente formen parte del sitio de unión de la bradicinina en el receptor B2.

Es interesante que las mutaciones en el receptor B2 que afectan la afinidad por el agonista cambian mínimamente la afinidad por el antagonista. Así, el agonista y el antagonista parecen no unirse al mismo sitio en el receptor B2, y los sitios pueden cuando mucho sobrelaparse parcialmente (Jarnagin, *et al.*, 1996; Leeb, *et al.*, 1997).

Se ha reportado también que el TM-III posibilita a los receptores de bradicinina para discriminar entre ligandos selectivos para los dos subtipos. Se ha demostrado que los aminoácidos del extremo carboxilo de los agonistas y antagonistas peptídicos, cuando se unen al receptor B2, quedan adyacentes a la de Ser¹¹¹ del receptor. Una lisina en esta posición, como es el caso del receptor silvestre B1 (Lys¹¹³), aporta una carga positiva que repele la arginina del extremo carboxilo de los péptidos selectivos B2 y atrae la carga negativa de los péptidos selectivos B1, los cuales carecen de la Arg del extremo carboxilo. Por lo tanto, los aminoácidos en esta sola posición son cruciales en la determinación de la selectividad hacia los agonistas peptídicos de los receptores B1 y B2 para bradicinina (Fathy, *et al.*, 1998).

La bradicinina se une al receptor B2, en tanto que los fragmentos truncados en el extremo carboxilo desArg⁹-BK y desArg⁹-Lys-BK, o desArg⁹-KD, unen al receptor B1. El hecho de que los análogos desArg⁹ actúen con alta afinidad como agonistas selectivos B1, enfatiza la importancia de este aminoácido en la selectividad de los subtipos de receptores.

El TM-VI está adyacente al dominio IC-III, el cual está implicado directamente en el acoplamiento de la proteína G en esta familia de receptores (Strader, *et al.*, 1994).

Se sabe además que la presencia de la Tyr¹³¹ es importante para la liberación de ácido araquidónico estimulada por bradicinina y la acumulación de los fosfatos de inositol (IP). Además las Tyr¹³¹, Tyr¹³² y el extremo carboxilo, parecen jugar un papel importante en las vías y en la internalización del receptor B2 para bradicinina (Prado, *et al.*, 1997).

3.5 Vías a las que se acopla el receptor B2.

El receptor B2, al ser activado puede acoplarse a proteínas Gq y activar la vía de recambio de fosfoinosítidos/Ca²⁺ vía PLC-β, (Bascands y Pecher, 1993; Smith, *et al.*, 1995) y/o la vía del ácido araquidónico/prostaglandinas vía PLA₂ (Bascands y Girolami, 1996; Burch y Axelrod, 1987).

Estudios recientes indican que los B2 pueden también acoplarse a la vía del AMPc por Gs. En músculo liso de traquea la bradicinina puede activar a la AC en una forma que involucra a la PKC y a la PLD (Liebmann, *et al.*, 1996b).

En células A431, provenientes de un carcinoma humano epidermal, la bradicinina estimula el incremento de la actividad de la AC y un incremento en la concentración de AMPc, por una vía distinta de las que involucran a la PKC, fosfolipasa D, prostaglandinas y Ca²⁺/calmodulina. En estas mismas células se ha descrito la estimulación del metabolismo de fosfoinosítidos, esto es, se activan dos vías de transducción independientes vía un sólo receptor B2 por dos diferentes proteínas G. Puede ocurrir que la acumulación de AMPc vía Gs, sirva como "switch" de la PKC que es rápidamente activada vía Gq e hidrólisis de fosfoinosítidos (Liebmann, *et al.*, 1996a).

En estudios en membranas de íleon de cuyo, se favorece la existencia de dos receptores B2 acoplados a diferentes vías de transducción, un receptor con afinidad picomolar que inhibe a la AC vía Gi y otro con afinidad nanomolar por la bradicinina que estimula el recambio de fosfoinosítidos (Liebmann, *et al.*, 1994).

Varios estudios han demostrado la activación independiente de PLC y PLA₂ mediante un sólo receptor B2, pero diferentes proteínas G en la misma célula.

En otras líneas celulares, como en células mesangiales de rata, la activación del receptor B2 de bradicinina por su ligando está asociada con la activación de la PLC y PLA₂ y con la inhibición de la formación de AMPc produciendo la contracción celular. La bradicinina induce tanto un incremento en la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i), como la producción de prostaglandina E-2 (PGE-2) vía PLA₂. Existen datos que suponen que el

incremento de la concentración de AMPc regula positivamente la expresión de mRNAs del receptor B2 de bradicinina (Castano, *et al.*, 1998).

Se ha reportado que en células de músculo liso de vías respiratorias (Murray y Kotlikoff, 1991), en células de riñón de perro (MDCK) (Jan, *et al.*, 1998) y neuronas de rata (Gelperin, *et al.*, 1994), la respuesta mediada por los receptores B2, involucra movilización de Ca^{2-} de reservorios intracelulares y entrada de Ca^{2+} extracelular por canales de calcio presentes en la membrana.

Intercomunicación

Las vías de transducción de la bradicinina también están intercomunicadas con vías activadas por otros receptores.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF), puede suprimir la activación de la vía de la AC inducida por la bradicinina en células A431, como consecuencia de la fosforilación en tirosina de la proteína G α (Liebmann, 1996a). También se han reportado que tanto agentes que elevan los niveles intracelulares de AMPc como la endotelina potencian la hidrólisis de fosfoinosítidos inducida por bradicinina (Chen, *et al.*, 1996).

La acumulación de AMPc inducida por bradicinina además promueve la traslocación de la isoforma épsilon de PKC (PKC ϵ), enzima que regula el crecimiento de las células neuronales PC-12 de rata, dando evidencia de un nuevo mecanismo de señalización que pudiera tener implicaciones en la diferenciación neuronal inducida por bradicinina (Graness, *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que la bradicinina regula la movilización de Ca^{2+} inducida por histamina en fibroblastos gingivales. Lo que ocurre en este sistema es la desensibilización heteróloga del receptor de histamina por la acción de la bradicinina mediante la activación de PKC (Niisato, *et al.*, 1997).

3.6 Regulación de la señal de bradicinina

Después de ser estimulados por el agonista, los receptores B2 se desensibilizan y son internalizados (Austin, *et al.*, 1997), en contraste con el receptor B1 el cual ni se desensibiliza ni se internaliza (Austin, *et al.*, 1997; Levesque, *et al.*, 1995). Estas diferencias se podrían explicar por la presencia, en el receptor B2, de una larga asa carboxilo-terminal que contiene serinas o tirosinas, sitios típicos de fosforilación (Hausdorff, *et al.*, 1989; Lohse, 1993; Ferguson, *et al.*, 1996).

Se ha reportado que en el receptor B2 que se expresa endógenamente en los fibroblastos humanos HF-15, ocurre una fosforilación reversible inducida por la unión del ligando. El receptor es fosforilado en serinas y treoninas, pero no lo es en tirosinas. Esta fosforilación es independiente de PKC y estudios *in vitro* sugieren a la β ARK1 como candidata para efectuar las fosforilaciones. La fosforilación entonces podría ser el mecanismo de desensibilización ya que además involucra la internalización del receptor (Blaukat, *et al.*, 1996).

Se ha reportado que la bradicinina cuando se une a receptores B2 presentes en líneas celulares de músculo liso, DDT₁ y MF-2, promueve el secuestro o reclutamiento de receptores ocupados y de subunidades α de proteínas G (Gq y Gi) en vesículas de plasmalema o de caveolina. Además de que este fenómeno se ha asociado con la desensibilización heteróloga del receptor α_1 -adrenérgico. Se ha propuesto que las vesículas de caveolina sirven como almacenes para el reclutamiento de componentes de una vía de señalización para incrementar la eficiencia y el rápido acoplamiento del receptor a más de un sistema efector o que estas vesículas atrapan componentes de las vías de señalización para terminar la señal (De Weerd y Leeb-Lundberg, 1997).

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TRABAJO

EXPERIMENTAL.

Como se mencionó, la bradicinina participa en un gran número de procesos biológicos, algunos relacionados con enfermedades y en general con la homeostasis del organismo. Los receptores para esta hormona son capaces de acoplarse a muy diversas vías de transducción que son reguladas de diferentes formas.

Los hepatocitos son usados frecuentemente en estudios de regulación metabólica y transducción de señales. Una de las mayores limitaciones en este tipo celular es que durante el cultivo primario pierden la habilidad de incrementar el calcio citosólico en respuesta a hormonas, un efecto principalmente debido al decremento drástico en el número de receptores presentes en la superficie celular.

La Clona 9 es una línea celular epitelial aislada a partir de un hígado normal de rata (Weinstein, *et al.*, 1975) que puede ser un modelo exitoso para el estudio de la acción hormonal. Trabajos realizados en el laboratorio, con esta línea celular, evidenciaron que la angiotensina II incrementa la concentración intracelular de calcio y la expresión del proto-oncogene *c-fos* a través de la activación del receptor AT₁ (García-Sáinz, *et al.*, 1998). Durante el curso de estos estudios se observó además que la bradicinina también es capaz de inducir la movilización de calcio intracelular en estas células. En este trabajo se presenta la caracterización de tal acción y los receptores y procesos involucrados.

IV. HIPÓTESIS

Los receptores para bradicinina presentes en los hepatocitos C9 se encuentran acoplados a vías de transducción que involucran la movilización intracelular de calcio.

V. OBJETIVOS

- Estudiar los efectos producidos por la bradicinina en los niveles de Ca²⁺ intracelular en la línea celular epitelial de hígado de rata C9.
- Determinar el subtipo de receptor para bradicinina que está mediando el efecto del nonapéptido en esta línea celular.
- Determinar la contribución de Ca²⁺ intracelular y extracelular en la respuesta a bradicinina en los hepatocitos C9.

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TRABAJO

EXPERIMENTAL.

Como se mencionó, la bradicinina participa en un gran número de procesos biológicos, algunos relacionados con enfermedades y en general con la homeostasis del organismo. Los receptores para esta hormona son capaces de acoplarse a muy diversas vías de transducción que son reguladas de diferentes formas.

Los hepatocitos son usados frecuentemente en estudios de regulación metabólica y transducción de señales. Una de las mayores limitaciones en este tipo celular es que durante el cultivo primario pierden la habilidad de incrementar el calcio citosólico en respuesta a hormonas, un efecto principalmente debido al decremento drástico en el número de receptores presentes en la superficie celular.

La Clona 9 es una línea celular epitelial aislada a partir de un hígado normal de rata (Weinstein, *et al.*, 1975) que puede ser un modelo exitoso para el estudio de la acción hormonal. Trabajos realizados en el laboratorio, con esta línea celular, evidenciaron que la angiotensina II incrementa la concentración intracelular de calcio y la expresión del proto-oncogene *c-fos* a través de la activación del receptor AT₁ (García-Sáinz, *et al.*, 1998). Durante el curso de estos estudios se observó además que la bradicinina también es capaz de inducir la movilización de calcio intracelular en estas células. En este trabajo se presenta la caracterización de tal acción y los receptores y procesos involucrados.

IV. HIPÓTESIS

Los receptores para bradicinina presentes en los hepatocitos C9 se encuentran acoplados a vías de transducción que involucran la movilización intracelular de calcio.

V. OBJETIVOS

- Estudiar los efectos producidos por la bradicinina en los niveles de Ca²⁺ intracelular en la línea celular epitelial de hígado de rata C9.
- Determinar el subtipo de receptor para bradicinina que está mediando el efecto del nonapéptido en esta línea celular.
- Determinar la contribución de Ca²⁺ intracelular y extracelular en la respuesta a bradicinina en los hepatocitos C9.

III. ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TRABAJO

EXPERIMENTAL.

Como se mencionó, la bradicinina participa en un gran número de procesos biológicos, algunos relacionados con enfermedades y en general con la homeostasis del organismo. Los receptores para esta hormona son capaces de acoplarse a muy diversas vías de transducción que son reguladas de diferentes formas.

Los hepatocitos son usados frecuentemente en estudios de regulación metabólica y transducción de señales. Una de las mayores limitaciones en este tipo celular es que durante el cultivo primario pierden la habilidad de incrementar el calcio citosólico en respuesta a hormonas, un efecto principalmente debido al decremento drástico en el número de receptores presentes en la superficie celular.

La Clona 9 es una línea celular epitelial aislada a partir de un hígado normal de rata (Weinstein, *et al.*, 1975) que puede ser un modelo exitoso para el estudio de la acción hormonal. Trabajos realizados en el laboratorio, con esta línea celular, evidenciaron que la angiotensina II incrementa la concentración intracelular de calcio y la expresión del proto-oncogene *c-fos* a través de la activación del receptor AT_1 (García-Sáinz, *et al.*, 1998). Durante el curso de estos estudios se observó además que la bradicinina también es capaz de inducir la movilización de calcio intracelular en estas células. En este trabajo se presenta la caracterización de tal acción y los receptores y procesos involucrados.

IV. HIPÓTESIS

Los receptores para bradicinina presentes en los hepatocitos C9 se encuentran acoplados a vías de transducción que involucran la movilización intracelular de calcio.

V. OBJETIVOS

- Estudiar los efectos producidos por la bradicinina en los niveles de Ca^{2+} intracelular en la línea celular epitelial de hígado de rata C9.
- Determinar el subtipo de receptor para bradicinina que está mediando el efecto del nonapéptido en esta línea celular.
- Determinar la contribución de Ca^{2+} intracelular y extracelular en la respuesta a bradicinina en los hepatocitos C9.

VI. MATERIAL Y MÉTODO.

Células epiteliales de hígado de rata de la línea celular C9 se obtuvieron de American Type Culture Collection. El medio F12K (Kaighn's Modification), el suero fetal bovino (SFB), el antibiótico-antimicótico (10 000 U/ml de penicilina G, 10 000 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 25mg/ml de anfotericina B), la tripsina y otros compuestos utilizados para el cultivo celular son de GIBCO BRL. El Fura-2/AM (ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-11)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-2(2' amino- 5' metilfenoxi)- etano -N, N, N', N-tetraacético, pentaacetoximetil éster) es de Molecular Probes. Los agonistas y antagonistas: bradicinina (BK), Lys-BK, des-Arg⁹-BK, N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK, des-Arg⁹,[Leu]⁸-BK, y la angiotensina II fueron adquiridos de Sigma y el Hoe 140 de RBI.

Determinación de calcio intracelular [Ca²⁺]_i.

Las células C9 se crecen en medio F12K suplementado con 10% de SFB, 100 μ g/ml de estreptomicina, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B a 37°C en una atmósfera de 5 % CO₂, hasta estar subconfluentes. Doce horas antes del experimento, este medio se sustituye por medio con 1% de SFB, con el propósito de eliminar moléculas presentes en el suero capaces de estimular a las células. En los experimentos con toxina pertussis (PTX) se agrega al medio de ayuno 1 μ g de la toxina. Las células se lavan y posteriormente se incuban durante una hora con 5 mM de Fura-2/AM en solución Krebs-Ringer-HEPES-glucosa con albúmina sérica bovina al 0.05%, pH 7.4 a 37°C. Se aspira el medio con Fura y se lavan las células tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). Las células se desprenden de los platos usando tripsina al 0.25 %. Se lavan tres veces por centrifugación a 3000 rpm por tres minutos, con solución Krebs-Ringer-HEPES-glucosa para eliminar el Fura-2/AM no incorporado. La determinación del calcio intracelular se realizó en agitación constante a 37° en un espectrofluorómetro (AMINCO-Bowman Series 2) a dos longitudes de excitación, 340 nm y 380 nm, y a 510 nm de emisión. La concentración intracelular de calcio se calcula usando la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left[\frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \right] \left[\frac{Sf_2}{Sb_2} \right]$$

Donde Kd representa la constante de afinidad del Fura-2 por el calcio (224 nM), R la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias. R_{min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar EGTA 5 mM y R_{máx} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con tritón X-100 al 10%. Sf₂ y Sb₂ son los coeficientes de proporcionalidad del Fura-2 libre y asociado al calcio en la longitud de onda 2, respectivamente (Grynkiewicz, *et al.*, 1985).

VII. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 11 la adición de bradicinina a las células C9 en suspensión, induce un incremento inmediato en la concentración de calcio intracelular. El máximo incremento fue de ~100-150 nM (de 2 a 2.5 veces) acorde con lo reportado para la angiotensina II en éstas células (García-Sáinz, *et al.*, 1996). Se obtuvo una EC_{50} de ~5 nM para el efecto de bradicinina (figura 12). La kalidina también induce un efecto dosis dependiente pero fue ligeramente menos efectivo y potente (EC_{50} ~20nM) que la bradicinina. En contraste, el agonista selectivo B1, des-Arg⁹-BK no incrementa la concentración de calcio intracelular aún a la concentración de 1 μ M. Estos datos sugieren que el receptor B2 media la respuesta a la cinina en esta línea celular. Sin embargo, la acción de antagonistas selectivos se estudió, para determinar de manera más clara al receptor de bradicinina involucrado. Ninguno de los antagonistas, por sí solos, inducen el incremento de calcio intracelular. Pero, cuando los antagonistas selectivos para el subtipo B2, Hoe 140, N-Adamantaneacetyl -D- Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}. D-Phe⁷]-BK, se adicionaron dos minutos antes de la bradicinina, inhibieron en una forma dosis dependiente el efecto del nonapéptido (fig.12B). El antagonista Hoe 140 (EC_{50} ~1 nM) fue más potente que el Na-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}. D-Phe⁷]-BK (EC_{50} ~20 nM). En contraste, el antagonista selectivo B1, des-Arg⁹, [Leu]⁸-BK, fue incapaz de inhibir el efecto de la bradicinina aún a altas concentraciones. Todos estos datos indican claramente que los receptores de bradicinina que median el incremento de calcio intracelular en este tipo celular son del subtipo B2.

Para determinar de dónde precedía el calcio que se acumulaba transitoriamente en el citosol en respuesta a la bradicinina, se realizaron experimentos en solución Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa con calcio normal (1.8 nM) (fig.13A), en solución sin calcio suplementado (fig.13C) o no (fig.13B) con 1 mM de EGTA. La ausencia de calcio extracelular disminuye la concentración intracelular basal de calcio, de 117 ± 4 nM (n=15) (1.8 mM de CaCl₂) a 48 ± 7 nM (n=11) (sin calcio extracelular) o 49 ± 5 nM (n=14) (sin calcio extracelular más 1 mM de EGTA). Bajo todas estas condiciones, 100 nM de bradicinina incrementó la concentración de calcio intracelular. Sin embargo, el incremento fue de menor magnitud en células incubadas en ausencia de calcio extracelular, por ejemplo de 46 ± 5 nM (n=6) en ausencia de calcio y sin EGTA, y de 43 ± 4 nM (n=8) en ausencia de calcio y con 1 mM de EGTA, con respecto al control con calcio que fue de 131 ± 10 nM (n=8). Estos datos indican que el incremento en la concentración de calcio intracelular en respuesta a bradicinina se debe parcialmente a la movilización de calcio de reservorios intracelulares.

Fig. 11

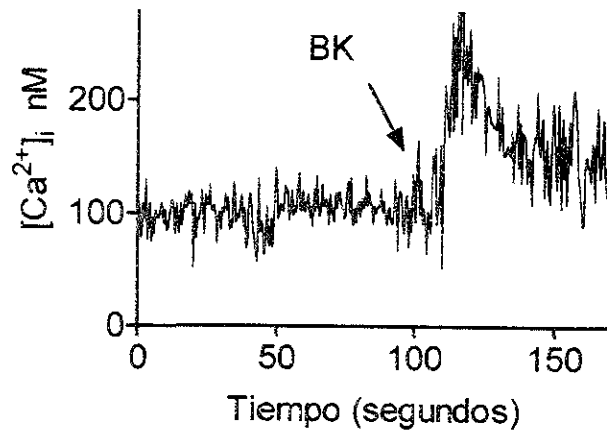


Fig. 12

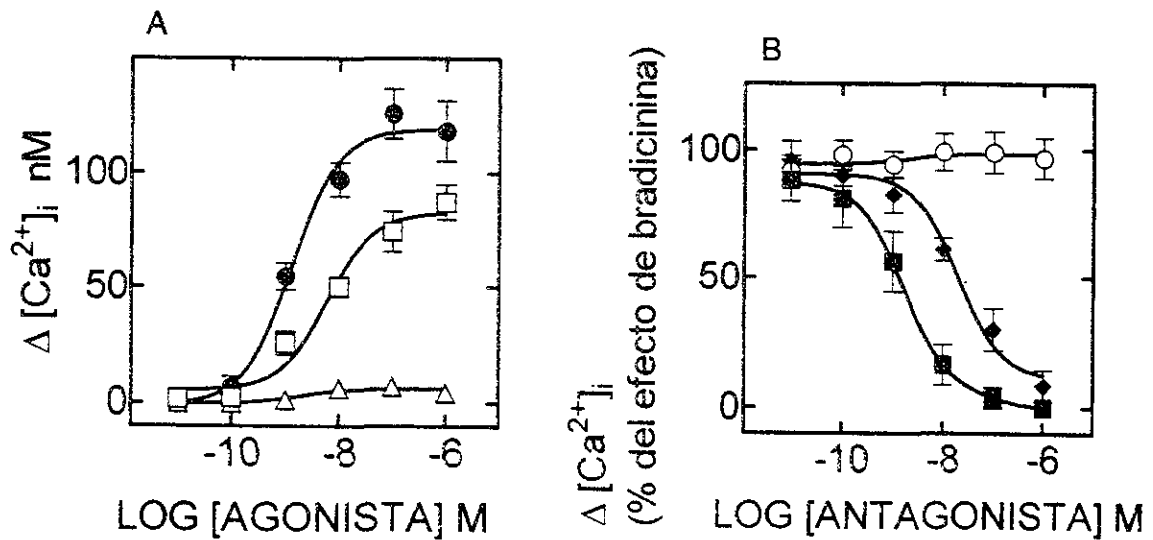


Fig 11. Incremento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a bradicinina. Hepatocitos de rata en suspensión, de la línea celular C9, fueron estimulados con 100 nM de bradicinina. El nonapéptido indujo un incremento inmediato en la concentración intracelular de calcio de 2 a 2.5 veces. La concentración intracelular de calcio se midió a partir de la fluorescencia emitida por el Fura-2. Aquí se presenta un trazo representativo.

Fig 12. Dosis-respuesta de agonistas y antagonista de bradicinina. En el panel A se presenta la curva dosis-respuesta de tres agonistas. Se usaron concentraciones crecientes desde 10^{-11} hasta 10^{-6} . La bradicinina (\bullet) fue capaz de inducir de forma más potente y efectiva ($EC_{50} \sim 5nM$) el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ que la kalidina (\square) ($EC_{50} \sim 20nM$). El agonista selectivo B1, des-Arg⁹-BK (Δ) no tiene efecto sobre el receptor a bradicinina endógeno de la células C9. En el panel B se presenta la curva de inhibición de tres antagonistas. Se usaron concentraciones crecientes desde 10^{-11} hasta 10^{-6} de los diferentes agentes. El antagonista Hoe 140 (\blacksquare) fue mas potente que el N-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp¹, Thi^{5,8} D-Phe⁷]-BK (\blacklozenge) en el bloqueo de la acción de la bradicinina. El antagonista selectivo B1, des-Arg⁹, [Leu]⁸-BK (\circ) fue incapaz de inhibir el efecto de la bradicinina. Estan graficados los promedios con el error estandar. El ajuste de la curva se hizo con la ayuda del programa GraphPrism 2.01 mediante la aplicación de un análisis de regresión lineal con una curva sigmoideal dosis-respuesta.

Con el fin de obtener mayor evidencia del posible mecanismo de aportación de calcio se usó la tapsigarguina. Este inhibidor de la ATPasa de calcio se usa comúnmente para depletar de los reservorios intracelulares de calcio con el fin de estudiar vías alternas de contribución de calcio. Se observó que $1\mu\text{M}$ de tapsigarguina induce un incremento relativamente lento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que alcanza una meseta después de 40-50 segundos en solución sin y con calcio (fig.13D, E y F). Interesantemente, después de la acción de la tapsigarguina, 100 nM de bradicinina fue capaz de inducir un ligero incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($42 \pm 12\text{ nM}$) ($n=8$) en células incubadas en solución con calcio (fig.13D). Sin embargo, tal efecto no se observó cuando las células fueron incubadas en solución sin calcio (fig.13E y F). Estos datos indican claramente que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, inducido por la bradicinina, se debe parcialmente a la entrada de calcio extracelular.

Con el propósito de profundizar en el mecanismo por el cual ocurre la entrada de calcio, se probaron dos bloqueadores para canales de calcio de membrana tipo L, se utilizó $1\mu\text{M}$ de nifedipina y $1\mu\text{M}$ de nitrendipina. Después de dos minutos de incubación con estos agentes, la respuesta de las células a bradicinina disminuyó en un 50% cuando se incubó con nifedipina y en un 36% para el caso de la nitrendipina (fig.14). Lo anterior sugiere la participación de los canales de calcio tipo L en el aumento de calcio intracelular inducido por el nonapéptido.

Para obtener mayor información acerca del tipo de proteína G que esta mediando la respuesta a bradicinina en las células C9, se hicieron experimentos con células pretratadas 12 hrs con 100 ng/ml de toxina pertussis. La respuesta a bradicinina, bajo estas condiciones, no mostró ningún cambio (fig.14). Lo que significa que no participan proteínas G sensibles a la toxina pertussis en el incremento de la concentración intracelular de calcio, en respuesta a la cinina, en esta línea celular.

Además se observó que después de la acción de 100 nM de bradicinina las células se tornaron refractarias a una segunda estimulación con la cinina (fig.15A). Sin embargo, la adición de un agente no relacionado como 100 nM de angiotensina II sí induce un claro incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fig. 15B). Estos resultados demuestran que la pérdida de la respuesta a una segunda estimulación de bradicinina no se debe al deterioro de la células ni a la depleción de calcio, sino a la desensibilización específica a este agente, es decir que los receptores B2 a bradicinina expresados en esta línea celular son blanco de desensibilización homóloga.

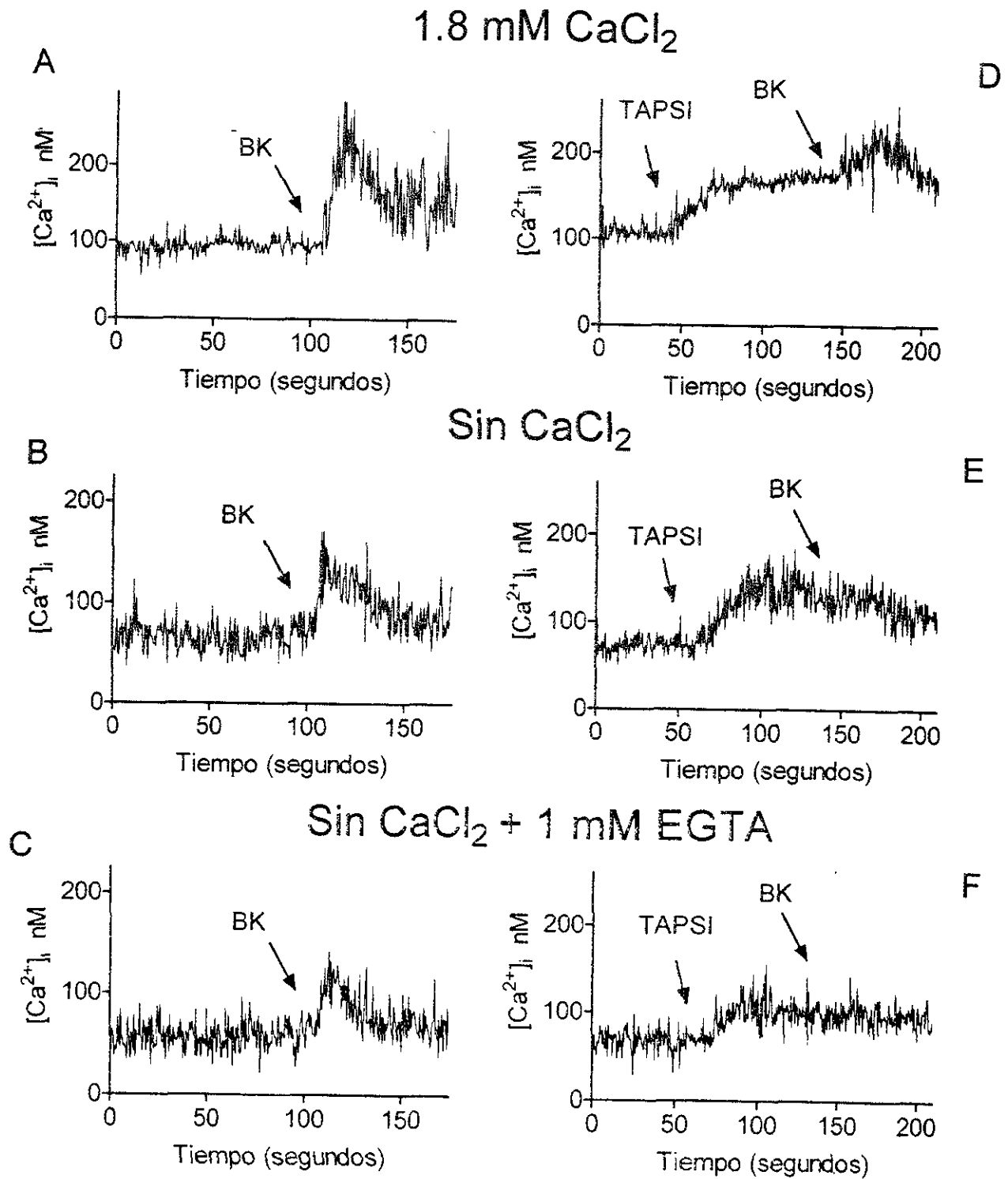


Fig 13. Efecto del calcio extracelular en la respuesta de bradicinina. Se probó el efecto de bradicinina en hepatocitos C9 en solución con 1.8 mM de calcio (A y D), en ausencia de calcio (B y E) y sin calcio y con 1 mM de EGTA (C y F). Bajo estas condiciones, 100 nM de bradicinina fue capaz de incrementar la $[Ca^{2+}]_i$, la respuesta fue menor en ausencia de calcio extracelular (B y C) con respecto al control (A). Además se probó la respuesta de bradicinina después de estimular a las células con $1 \mu M$ de taspigarguina. La bradicinina incrementó la concentración intracelular de calcio solamente en las células en solución con 1.8 mM de calcio (D), en ausencia de calcio extracelular fue incapaz de hacerlo (E y F).

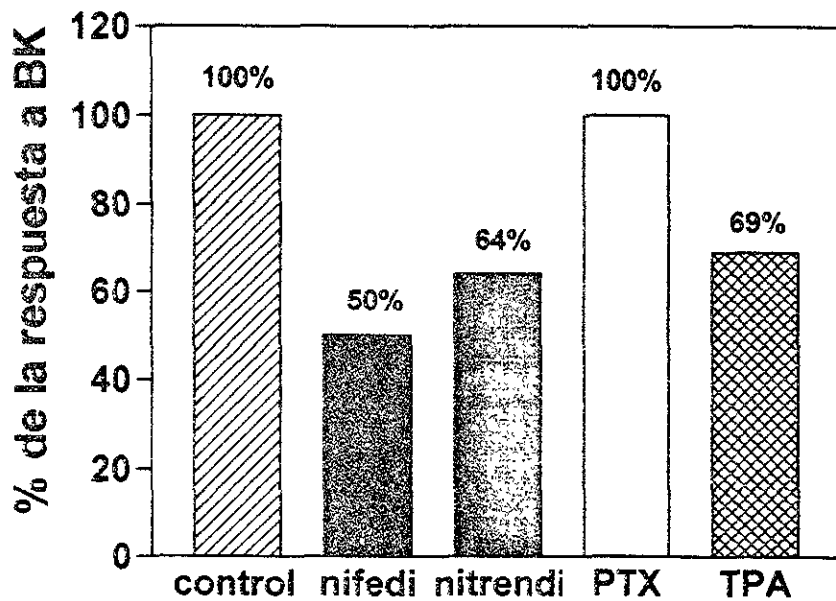


Fig 14. Efecto de diferentes agentes sobre la respuesta a bradicinina. Se estudió el efecto de 100 nM de bradicinina en células incubadas por dos minutos con dos bloqueadores de canales de calcio de membrana tipo L. El efecto de la bradicinina disminuyó un 50% cuando se incubó con 1 μ M de nifedipina y un 46% cuando se usó 1 μ M de nitrendipina. Se probó además el efecto de la bradicinina en células incubadas doce horas con 100 ng/ml de toxina pertussis (PTX) y en células incubadas dos minutos con TPA. La toxina pertussis no tuvo efecto sobre el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el nonapéptido; en tanto que el ester de forbol hizo decrecer la respuesta en un 31% con respecto al control.

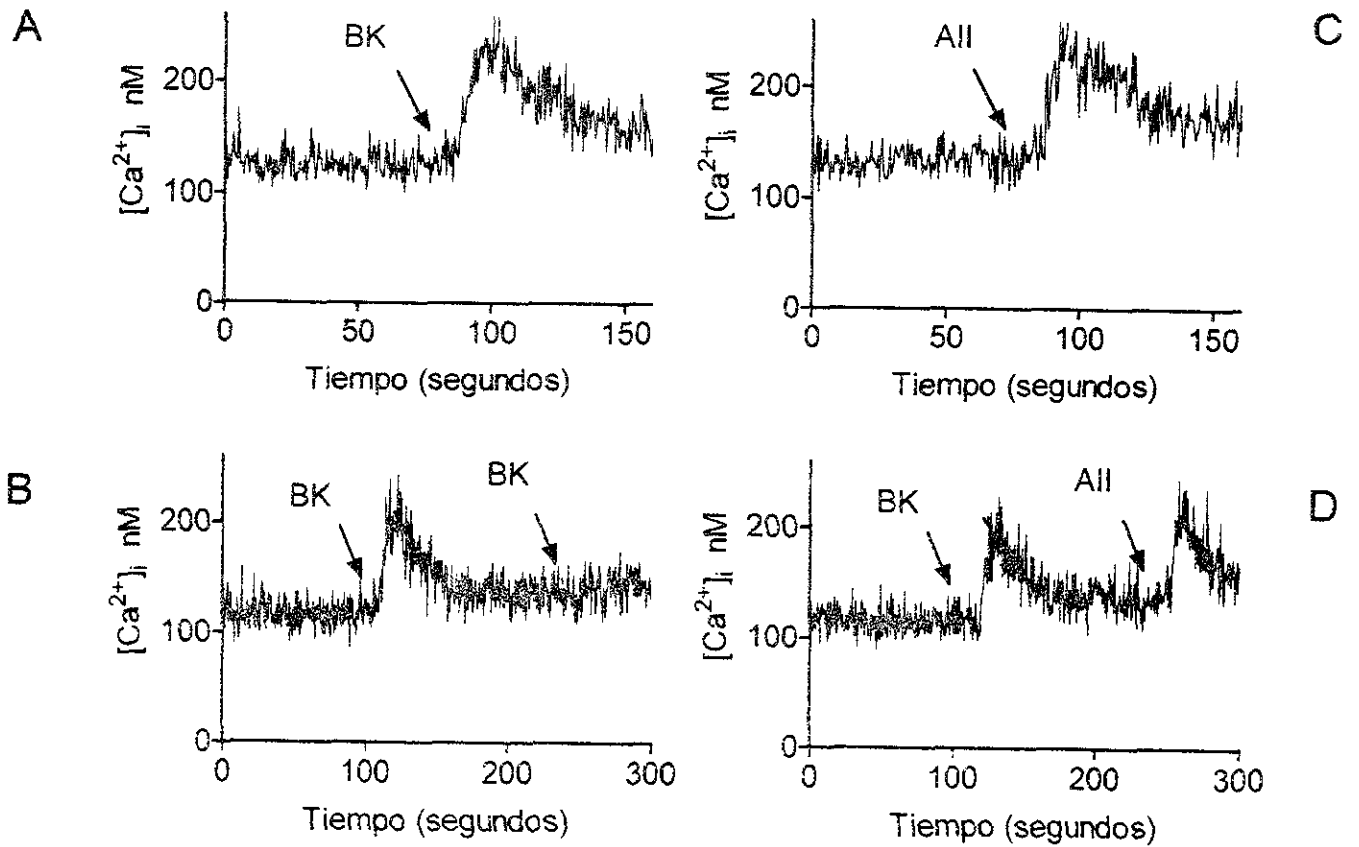


Fig 15. Desensibilización homóloga de la respuesta a bradicinina en hepatocitos C9. La adición de 100 nM de bradicinina a las células C9, después de un primer estímulo con la misma hormona, no es capaz de inducir incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (panel B) a diferencia del estímulo de 100 nM de angiotensina II (D), la cual induce un incremento semejante al inducido en células no estimuladas previamente con bradicinina (C). En el panel A se muestra el control con bradicinina 100 nM.

El TPA tuvo efecto sobre la respuesta de bradicinina. Cuando se incubaron las células con $1\mu\text{M}$ del éster de forbol durante 2min, la respuesta a bradicinina disminuyó un 31% con respecto al control (fig.14). lo que sugiere que la PKC podría estar fosforilando e inactivando a alguno de los elementos que participan en la respuesta que lleva a la liberación de calcio intracelular por la bradicinina en esta línea celular.

VIII. DISCUSIÓN

Los datos presentados demuestran que los agonistas selectivos para receptores del subtipo B2 de bradicinina son capaces de incrementar la concentración intracelular de calcio, a diferencia del agonista selectivo B1 des-Arg⁹-BK que no induce respuesta alguna. De la misma forma, los antagonistas selectivos B2, Hoe 140, N-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK, inhiben el efecto del nonapéptido, en tanto que el antagonista selectivo B1, des-Arg⁹. [Leu]⁸-BK, es incapaz de hacerlo. Estos resultados nos permiten concluir que el subtipo de receptor que media el incremento de calcio intracelular en la línea celular de hepatocitos de rata C9, es del subtipo B2.

Los experimentos en los que se eliminó la participación del calcio extracelular, ya sea por ausencia del catión en el medio de incubación o por el uso de bloqueadores específicos de canales de calcio de membrana tipo L, y los experimentos donde se eliminó el calcio de reservorios intracelulares con el uso de la tapsigarguina, muestran claramente que el incremento en la concentración intracelular de calcio inducido por la bradicinina depende tanto de la liberación intracelular de calcio, como de la entrada de este ión proveniente del medio extracelular, posiblemente con la participación de canales tipo L. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura de estudios realizados en células de músculo liso de vías respiratorias de humano (Murray y Kotlikoff, 1991), en células de riñón de perro (MDCK) (Jan. *et al.*, 1998) y en neuronas de rata (Gelperin, *et al.*, 1994), donde la respuesta mediada por los receptores B2, involucra movilización de Ca²⁺ de reservorios intracelulares y del medio extracelular por canales de calcio de membrana.

Los receptores B2 se acoplan generalmente a una proteína Gαq que activa a la PLC-β, y estimula el recambio de fosfoinosítidos/Ca²⁺ (Bascands. *et al.*, 1993; Smith, *et al.*, 1995). Es muy probable que sea esta vía la que este participando en la respuesta a la cinina en los hepatocitos C9, y que la liberación de calcio de reservorios intracelulares se deba a la unión del IP₃ a sus receptores específicos en retículo, como sucede con la angiotensina II (García-Sainz, *et al.*, 1998).

Si el receptor B2 esta acoplado sólo a la proteína Gαq, la activación de canales de calcio de membrana tipo L podría estar ocurriendo por la acción del IP₃.

En algunas líneas celulares se ha demostrado que el IP₃ puede directamente activar canales de calcio específicos en la membrana plasmática. Por ejemplo, en linfocitos la entrada de calcio inducida por IP₃ parece estar mediada por un nuevo receptor de membrana para IP₃ (Khan, *et al.*, 1992). De igual forma en la membrana plasmática de células olfatorias se ha

reportado la presencia de canales de calcio sensibles a IP_3 (Fadool y Ache, 1992; Kalinoski, 1992; Restrepo, *et al.*, 1990.) En las células C9, el IP_3 generado de la activación de la PLC por el receptor B2 de bradicinina, podría estar activando directamente la apertura de los canales de calcio de membrana.

Estudios recientes han demostrado que los receptores B2 pueden acoplarse simultáneamente a la vía de la adenilato ciclasa mediante una proteína $G_{\alpha s}$ y a la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} a través de una proteína $G_{\alpha q}$, esto es, se activan dos vías de transducción independientes de un sólo receptor B2 mediante dos diferentes proteínas G (Liebmann, 1996a). Estudios en membranas de íleon de cuyo, favorecen la existencia de dos receptores B2 acoplados a diferentes vías de transducción, un receptor con afinidad picomolar que inhibe a la AC vía G_i y otro con afinidad nanomolar por la bradicinina que estimula el recambio de fosfoinosítidos (Liebmann, 1994).

Se sabe que los canales de calcio de membrana tipo L son regulados por la PKA (Trends, 1998). El receptor B2 para bradicinina en los hepatocitos C9 podría estar acoplado también a la proteína G_s , induciendo la acumulación de AMPc y la activación de la PKA, siendo esta la responsable de activar la apertura de los canales de membrana tipo L.

Esta hipótesis no se contradice con los resultados de los experimentos en células incubadas con toxina pertussis, que indican que las proteínas G que participan en la respuesta de bradicinina en esta línea celular, son insensibles a esta toxina.

Estudios recientes han demostrado que el dímero $\beta\gamma$ al disociarse de la subunidad α de la proteína G_i activada, también es capaz de activar moléculas efectoras como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y algunos tipos de canales iónicos (Conklin y Bourne, 1993; Logothetis, *et al.*, 1987; Okabe, *et al.*, 1990). Sin embargo, los dímeros $\beta\gamma$ de las proteínas G activadas por el receptor B2 de bradicinina en las células C9, no podrían estar participando en el incremento de la concentración intracelular, ya que los experimentos usando toxina pertussis descartan la participación de una proteína G_i .

Se demostró que el sistema de transducción de la bradicinina en esta línea celular es objeto de desensibilización homóloga, al observar la ausencia de respuesta a una segunda estimulación de bradicinina, a diferencia de lo ocurrido cuando en el segundo estímulo se utilizó angiotensina II.

Se sabe que después de estimular los receptores B2 con el agonista, éstos se desensibilizan y son internalizados, en contraste con el receptor B_1 el cual ni se desensibiliza ni se internaliza (Austin, *et al.*, 1997; Levesque, *et al.*, 1995). Estas diferencias se podrían

explicar por la presencia, en el receptor B2, de una larga asa carboxilo-terminal que tiene serinas y tirosinas que pueden ser fosforiladas (Hausdorff, *et al.*, 1989; Lohse, 1993; Ferguson, *et al.*, 1996). Se ha reportado que en el receptor B2 que se expresa endógenamente en los fibroblastos humanos HF-15 ocurre una fosforilación inducida por la unión del ligando (Blaukat, *et al.*, 1996).

En el proceso de desensibilización homóloga observado en el receptor B2 endógeno de las células C9, podría estar ocurriendo la fosforilación del receptor.

Se ha reportado que la unión de bradicinina a sus receptores específicos en algunas líneas celulares, promueve el secuestro o reclutamiento de receptores ocupados y de subunidades α de proteínas G (Gq y Gi) en vesículas de plasmalema o de caveolina. Se piensa que las vesículas de caveolina sirven como almacenes para el reclutamiento de componentes de una vía de señalización para incrementar la eficiencia y el rápido acoplamiento del receptor a más de un sistema efector; o bien que estas vesículas atrapan componentes de las vías de señalización para terminar la señal (De Weerd y Leeb-Lundberg, 1997). En los hepatocitos de rata C9, podría estar ocurriendo el secuestro e internalización de receptores y de otras moléculas involucradas en la vía de señalización, dando como resultado que la célula sea incapaz de responder eficientemente a la hormona.

Por otro lado el TPA tuvo efecto sobre la respuesta de bradicinina, la cual disminuyó un 31%. Lo que sugiere que la PKC podría estar fosforilando e inactivando a alguno de los elementos que participan en la respuesta a bradicinina en esta línea celular. La activación de la PKC por el PMA podría estar evidenciando un mecanismo de regulación de la respuesta a bradicinina en esta línea celular, que podría involucrar la fosforilación del receptor, pero además la regulación a otro nivel en la cascada de transducción. Por ejemplo la PKC podría estar modulando los canales de calcio de membrana abiertos en respuesta al nonapéptido. Estos aspectos serán sujetos de experimentos posteriormente.

La mayoría de las cininas, incluida la bradicinina, son generadas *in situ* a partir de sus precursores los kininógenos después de la activación de las kalikreinas del plasma y tisulares por trauma tisular, inflamación, anoxia o una baja en el pH (Dray y Perkins, 1993). La bradicinina actúa cerca de los sitios de su producción sobre numerosos tipos celulares y produce una gran variedad de acciones incluyendo relajación y contracción de músculo liso, estimulación de células del sistema inmune, secreción glandular y activación de vías neurales (Leeb, *et al.*, 1997). Las acciones específicas de la bradicinina en cada tipo celular están mediadas por distintos subtipos de receptores y vías de segundos mensajeros, lo cual subraya

la importancia de estudiar el subtipo de receptor involucrado y la vía de transducción en cada tejido de interés.

Es importante mencionar que es de gran utilidad la información que se genere respecto a la forma en la que los receptores para cininas, y en particular el receptor para bradiginina, actúan en los diferentes tipos celulares, ya que esta información podría ser utilizada para generar terapias contra enfermedades en las que se sabe que la vía transduccional de la bradiginina esta involucrada, como el asma, algunas alergias, la artritis reumatoide, pancreatitis aguda, shock endotóxico y en la mayoría de los procesos inflamatorios.

IX. CONCLUSIONES

En los hepatocitos de rata de la línea celular C9, en cultivo, se expresa endógenamente el receptor B2 para bradiginina. La estimulación de este receptor por la cinina induce un incremento en la concentración de calcio intracelular. En este incremento participan la liberación de calcio de reservorios intracelulares y la entrada extracelular de calcio por canales de calcio de membrana tipo L.

La respuesta al nonapéptido en esta línea celular ocurre por una vía que no involucra proteínas sensibles a toxina pertussis, que es objeto de desensibilización homóloga y que además podría ser regulada por la PKC.

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

la importancia de estudiar el subtipo de receptor involucrado y la vía de transducción en cada tejido de interés.

Es importante mencionar que es de gran utilidad la información que se genere respecto a la forma en la que los receptores para cininas, y en particular el receptor para bradicinina, actúan en los diferentes tipos celulares, ya que esta información podría ser utilizada para generar terapias contra enfermedades en las que se sabe que la vía transduccional de la bradicinina esta involucrada, como el asma, algunas alergias, la artritis reumatoide, pancreatitis aguda, shock endotóxico y en la mayoría de los procesos inflamatorios.

IX. CONCLUSIONES

En los hepatocitos de rata de la línea celular C9, en cultivo, se expresa endógenamente el receptor B2 para bradicinina. La estimulación de este receptor por la cinina induce un incremento en la concentración de calcio intracelular. En este incremento participan la liberación de calcio de reservorios intracelulares y la entrada extracelular de calcio por canales de calcio de membrana tipo L.

La respuesta al nonapéptido en esta línea celular ocurre por una vía que no involucra proteínas sensibles a toxina pertussis, que es objeto de desensibilización homóloga y que además podría ser regulada por la PKC.

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

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Add Alla, S., U. Quitterer, S. Grigoriev, A. Maidhof, M. Haasemann, K. Jarnagin y W. Müller-Esterl. 1996. *J. Biol. Chem.* 271: 1748-1757.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y J. D. Watson. 1994. *Molecular Biology of de Cell*. 3rd de Garland Pub. Unc. New York. 1294 pp.
3. Attword, T.K.; E. Eliopoulos, J.B.C, Findlay .1991. *Gene* .98:153-159
4. Austin, C. E., A. Faussner, H. E. Robinson, S. Chakravarty, D. J. Kyle, J. M. Bathon y D. Proud. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:11420-11425.
5. Bachvarov, D., E. Saint-Jacques, J-F. Larrivée, L. Levesque, F. Rioux, G. Drapeau y F. Marceau. 1995. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275:1623-1630.
6. Barnes, P. J. 1992. *Thorax*. 47: 979-983.
7. Bascands, J. L., C. Pecher, S. Rouaud, C. Emond, J. Leung, M. J. Bastie, R. Burch, D. Regoli y J. P. Girolami. 1993. *Am. J. Physiol.* 264:F548-F556.
8. Bascands, J. L. y J. P. Girolami. 1996. *Méd. Sci.* 12: 582-592.
9. Berridge, M.J. 1987. *Annu. Rev. Bioch.* 56:159-193.
10. Berridge, M. J. 1993. *Nature*. 361:315-325.
11. Bhoola, K. D., C. D. Figueroa y K. Worthy. 1992. *Pharmacol. Rev.* 44:1-80.
12. Birnbaumer, L., J. Abramowitz y A.M. Brow. 1990. *Biochim. Biophys. Acta.* 1031: 163-224.
13. Birnbaumer, L. 1992. *Cell*. 71:1069-1072.
14. Birnbaumer, M. 1995. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 15:131-160.
15. Blaukat, A., S. A. Alla, M. J. Lohse y W. Müller-Esterl. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:32366-32374.
16. Bong-Lee, S. y S. G. Ree. 1995. *Curr. Op. Cell Biol.* 7:183-189.
17. Brown, M., M. Webb, E. Phillips, E. Skidmore y P. McIntyre. 1995. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73:780-786.
18. Burch, R. M y J. Axelrod. 1987. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:6374-6378.
19. Burgerin, B. M. y J. L. Bos. 1995. *Trends Biochem Sci.* 20:18-22
20. Carozzi, A. C., M. Camps, P. Gierschik y P. Parker. 1993. *FEBS*. 315:340-342.
21. Casey, P.J. y A. G. Gilman. 1988. *Nature*. 333:129-134.
22. Castano, M. E., J. P. Schanstra, C. Hirtz, J. B. Pesquero, C. Pecher, J. P. Girolami y J. L. Bascands. 1998. *Am. J. Physiol.* 43:F532-F540.
23. Changeux, J.P. 1993. *Sci. Am.* 269:30-37.
24. Charbonneau, H. y N. K. Tonks, 1992. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8:463-493.
25. Chen, C. C., J. Chang y W. C. Chen. 1996. *Glia*. 16:210-217.
26. Claphan, D. E. 1995. *Cell*. 80:259-268.
27. Clemens, J. A. 1994. *Mol. Cell Endocrinol.* 99: C1-C6.
28. Conklin B. R. y H. R. Bourne. 1993. *Cell*. 73: 631-641.
29. De Weerd, W. F. C. y L. M. F. Leeb-Lundberg. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:17858-17866.
30. Deblois, D., J. Bouthillier y F. Marceau. 1989. *Immunopharmacology*. 17: 187-198.
31. Denhardt, D. T. 1996. *Biochem. J* 318:729-747.
32. Dixon, R. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132.
33. Dray A. y M. Perkins. 1993. *Trends Neurosci.* 16:99-104.

34. Dreher, M.L. y M.R. Hanley. 1988. *TIPS*. 9:114-115.
35. Dohlman H.G., J. Thorner, M. G. Caron y R.J. Lefkowitz. 1991. *Ann. Rev. Biochem.* 60: 653-688.
36. Erdős. E. G.1990. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15:520-524.
37. Exton. J.H. 1994. *Annu. Rev. Physiol.* 56:349-369.
38. Fadool. D.A. y B.W. Ache. 1992. *Neuron.* 9:907-918.
39. Farmer, S. G. y R. M. Burch. 1992. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 32: 511-36.
40. Fathy. D. B., S. A. Mathis, T. Leeb y F. Leeb-Lundberg. 1998. *J. Biol. Chem.* 273:12210-12218.
41. Ferguson, S. S., L. S. Barak, J. Zhang y M. G. Caron. 1996. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74:1095-1110.
42. Ferguson, S. S., J. Zhang, L. S. Barak y M. G. Caron. 1998. *Life Sciences.* 62:1561-1565.
43. Fischer. G. 1994. *Trends Biochem Sci.* 19:164-168.
44. Fong T. M., H Yu, RRC Huang y CD Strader. 1992. *Biochemistry.* 31:1806-3111.
45. Fong T. M., M. A. Cascierei, H. Yu, A. Bansal, C. Swain y C. D. Strader. 1993. *Nature.* 362:350-353.
46. García-Sáinz, J.A. 1996. *Hormonas: mensajeros químicos y comunicación celular.* 2a ed. La ciencia desde México. México, 119 pp.
47. García-Sáinz, J.A., A. García-Caballero y C. González-Espinosa.1998. *Eur. J. Pharmacol.* 362:235-243.
48. Gaudreau, P., J Barabé, S. St-Pierre y D. Regoli. 1981. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59:371-379.
49. Gelperin. D., D. Mann, J. Del Valle y J. W. Wiley. 1994. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271:507-514.
50. Geppetti, P. 1993. *Regul. Pep.* 47:1-23.
51. Goodman & Gilman's. 1996. *The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9th ed. Intercontinental. McGraw-Hill. New York. 1905pp.
52. Graness, A., A. Adomeit. B. Ludwig, W. D. Muller, R. Kaufmann y C. Liebmann. 1997. *Bioche. J.* 327:147-154.
53. Grynkiewicz. G., M. Poenie y R. Tsien. 1985. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450.
54. Hall. J. 1997. *Gen. Pharmac.* 28:1-6.
55. Hamm.H. E. y A. Gilchrist. 1996. *Curr. Op. Cell Biol.* 8:189-196.
56. Hausdorff. W. P., M. Bouvier, B. F. O'Dowd, G. P. Irons, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:12657-12665.
57. Hausdorff. W. P., M.G. Caron y R. J. Lefkowitz. 1990. *FASED J.* 4:2881-2889.
58. Henderson.R., J.M. Baldwin, T.A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann y K.H. Downing. 1990. *J. Mol. Biol.* 213:899-929.
59. Hepler.J. R., A.G. Gilman. 1992.*TIBS.* 17:383-387.
60. Hernández-Sotomayor, M. T. 1995. *Ciencia.* 46:533-541.
61. Herzig, M., N. R. Nash, M. Connolly, D. J. Kyle y L. M. F. Leeb-Lundberg. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:29746-29751.
62. Hess, J. F., Borkowski, G. S. Young, C. D. Strader y R. W. Ransom. 1992. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:260-268.
63. Hug, H y T.F. Sarre. 1993. *Bioceh.J.* 291:329-343
64. Humphrey P.P., P. Hartin, D. Hoyer. 1993. *Trends Pharmacol. Sci.* 14:233-236

65. Inglese, J., N. J. Freedman, W. Koch y R.J. Lefkowitz. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 23735-23738.
66. Jaken, S. 1996. *Curr. Op. Cell Biol.* 8: 168-173.
67. Jan, Ch., Ch. Ho, S. Wu, Ch. Tseng. 1998. *Eur. J. Pharmacol.* 35:219-133.
68. Jans, D.A. 1994. *FASEB.* 8:941-987
69. Jarnagin, K., S. Bhakta, P. Zuppan, C. Yee, T. Ho, T. Phan, R. Tahilramani, J. H. Pease, A. Miller y R. Freedman. 1996. *J. Biol. Chem.* 271:28277-28286.
70. Kage R., A.A. Hershey, JE Krause, ND Boyd y SE Leeman. 1991 *Soc Neurosci. Abstr.* 17:805.
71. Kalinoski, D. L. 1992. *Biochem. J.* 281:449-456.
72. Kammer, S., A. Braun, N. Arnold y A. A. Roscher. 1995. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211:226-233.
73. Kennedy ME, LE Limbird. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:8003-8011.
74. Khan, A. A. J. P. Steiner, M.G. Klein, M.F. Schneider y S.H. Snyder. 1992. *Science.* 257:815-818.
75. Kobilka B. K., T. S. Kobilka, K. Daniel, J. W. Regan, M. G. Caron y R. J. Lefkowitz. 1988. *Science.* 240:1310-1316.
76. Kyle, D. J. 1995. *Curr. Pharmaceut. Des.* 1:233-254.
77. Leeb, T., S. A. Mathis y L. M. F. Leeb-Lundberg. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:311-317.
78. Lefkowitz, R. J. y M. G. Caron. 1988. *J. Biol. Chem.* 263:4993-4998.
79. Lefkowitz, R. J. 1996. *Nature Biotechnology.* 14:283-286.
80. Lenhinger, A. , Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1992. *Principles of Biochemistry.* 2 ed. Edit. Worth. 1013pp.
81. Levesque, L., N. Harvey, F. Rioux, G. Drapeau y F. Marceau. 1995. *Immunofarmacology.* 29:141-147.
82. Liebmann, C., K. Mammery y A. Grane. 1994. *Eur. J. Pharmacol.* 288:35-43.
83. Liebmann, C., A. Graness, B. Ludwig, A. Adomeit, A. Boehmer, F. Boehmer, B. Nürnberg y R. Wetzker. 1996a. *Biochem. J.* 313:109-118.
84. Liebmann, C., A. Graness, A. Boehmer, M. Kovalenko, A. Adomeit, T. Steinmetzer, B. Nürnberg, R. Wetzker y F. Boehmer. 1996b. *J. Biol. Chem.* 271:31098-31105.
85. Linder, M. E . 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 90: 3675-3679.
86. Linz, W., G. Wiemer, P. Gohlke, T. Unger y B. A. Schölkens. 1995. *Pharmacol. Rev.* 47:25-49.
87. Liu X. B., D. Davis y D. L. Segaloff. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:1513-1516.
88. Logothetis, D.E., Y. Kurachi, J. Galper, E.J. Neer y D.E. Clapham. 1987. *Nature.* 325:321-326.
89. Lohse, M. J. 1993. *Biochem. Biophys. Acta.* 1179:171-188.
90. Lopes, P. y R. Couture. 1992. *Eur. J. Pharmacol.* 210:137-147.
91. Ma, J., D. Wang, L. Chao, y J. Chao. 1994. *Gene,* 149:283-288.
92. McEachern, A. E., E. R. Shelton, S. Bhakta, R. Obenolte, C. Bach, P. Zuppan, J. Fujisaki, R. W. Aldrich y K. Jarnagin. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 88:7724-7728.
93. MacNeil, T., K. K. Bierilo, J. G. Menke y J. F. Hess. 1995. *Biochim. Biophys. Acta.* 1264:223-228.
94. Marceau, F. 1995. *Immunofarmacology.* 30:1-26.
95. Massagué, J., L. Attissano y J. Wrana. 1994. *Trends Cell Biol.* 4:172-178.

96. McIntyre, P., E. Phillips, E. Skidmore, M. Brown y M. Webb. 1993. *Mol. Pharmacol.* 44:346-355.
97. Menke, J. G., J. A. Borkowski, K. K. Bierilo, T. MacNeil, A. W. Derrick, K. A. Schneck, R. W. Ransom, C. D. Strader, D. L. Linemeyer y J. F. Hess. 1994. *J. Biol. Chem.* 269:21538-21586.
98. Michell, R.H. 1975. *Biochem. Biophys. Acta.* 415:81-147.
99. Mombouli J. V. y P. M. Vanhoutte. 1995. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxicol.* 35:679-705.
100. Mons, N., L. Decorte, R. Jaffard y D. M. F. Cooper. 1998. *Life-Sciences.* 62:1647-1652.
101. Müller-Esterl, W., S. Iwanaga y S. Nakanishi. 1986. *Trends Biochem. Sci.* 11:336-339.
102. Mumby, S.M., c: Kleuss y A. G. Gilman, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91: 2800-2804.
103. Murone, C., R. B. Perich, I. Schlawe, S. Y. Chai, D. Casley, D.P. MacGregor, W. Müller-Esterl y F. A. Mendelsphn. 1996. *Eur. J. Pharmacol.* 306:237-247.
104. Murray, R. y M. Kotlikoff. 1991. *J. Physiol.* 435:123-144.
105. Nardone, J. Y P. J. Hogan. 1994. *Proc. Natl. Sci. Acad. U. S. A.* 91:4417-4421.
106. Niisato, N., Y. Ogata, S. Nakao, S. Furuyama y H. Sugiya. 1997: *Cell Calcium.* 21:345-352.
107. Nobes, C y A. Hall. 1995. *Cell.* 81:53-62.
108. Novotny, E. A., D. L. Bednar, M. A. Connolly, J. R. Connor y T. M. Stormann. 1994. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:523-530.
109. O'Dowd BF, M Hnatowich, MG Caron, RJ Lefkowitz y M Bouvier. 1989. *J. Biol. Chem.* 264:7564-7569.
110. Okabe, K., A. Yatani, T. Evans, Y. K. Ho, J. Codina, L. Birnbaumer y A. M. Brow. 1990. *J. Biol. Chem.* 265:12854-12858.
111. Okamoto, H. y L. M. Greenbaum. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:701-708.
112. Papac D. I. K. R. Thornburg, E. E. Bullesbach, R. K. Crouch y D. R. Knapp. 1992 *J. Biol. Chem.* 267:16889-168894.
113. Pitcher, J. A. 1992. *Science.* 257:1264-1267.
114. Pitcher, J. A., Oayne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A: A. y R.J. Lefkowitz. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:8343-8347.
115. Pitcher, J. A., N. J. Freedman y R. J. Lefkowitz. 1998. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 653-692.
116. Polosa, R. 1993. *Allergy.* 48:217-225.
117. Prado, G., L. Taylor y P. Polgar. 1997. *J. Biol. Chem.* 272:14638-14642.
118. Premont, R.T., Inglese, J., y R. J. Lefkowitz. 1995. *FASEB J.* 9:176-182.
119. Rands E., M. R. Candelore, A. H. Cheung, W. S. Hill, C. D. Strader y RAF Dixon. 1990. *J. Biol. Chem.* 265: 10⁷59-10764.
120. Regoli D. y J. Barabé. 1980. *Pharmacol. Rev.* 32:1-46.
121. Regoli, D., F. Marceau y J. Lavigne. 1981. *Eur. J. Pharmacol.* 71:105-115.
122. Regoli, D., S. Nsa, A. Rizzi y F. Gobeli. 1998. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 1- 10.
123. Restrepo, D., T. Miyamoto, B.P. Bryant y J.M Teeter. 1990. *Science.* 249:1166-1168.
124. Rhee, S.G , P. G. Shu, S.H. Ryu y S.Y Lee. 1989. *Science.* 244:546-550.

125. Rocha e Silva, M., W. T. Beraldo y G. Rosenfeld. 1949. Bradikinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Am J. Physiol.* 156: 261-273.
126. Rodell, T. C. 1996. *Immunofarmacology.* 33:279-283.
127. Schini, V. B., C. Boulanger, D. Regoli y P. M. Vanhoutte. 1990. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252:581-585.
128. Schlessinger y Ullrich, 1992. *Neuron.* 9:383-391.
129. Schwartz, T.W. 1994. *Current Opinion in Biotechnology.* 5:434-444.
130. Sivilotti, L. y D. Colquhoun. 1995. *Science.* 269:1681-1682.
131. Smith, J. A., C. Webb, J Holford y G. M. Burgess. 1995. *Mol. Pharmacol.* 47:525-534.
132. Steranka, L. R., D.C. Manning, C. J. Dehaas, J. W. Ferkany, S. A. Borosky, J. R. Connor, R. J. Vavrek, J. M. Stewart y S. H. Snyder. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:3245-3249.
133. Stewart, J. M. 1995. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73:787-790.
134. Strader, C. D., T. M. Fong, M. R. Tota y D. Underwood. 1994. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 101-132.
135. Su, J., A. Batzer y J. Sap. 1994.. 269:18731-18734.
136. Tang, W. J. Y A. G. Gilman. 1992. *Cell.* 70:869-872.
137. Taylor, S. S., J.A. Buechler y W. Yonemato. 1990. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971-1005.
138. Toda, M., K. Bian. T. Akiba y T. Okamura. 1987. *Eur. J. Pharmacol.* 135:321-329.
139. Tousignant, C..S. Dion. G. Drapeau y D. Regoli. 1987. *Neuropeptides.* 9:333-343.
140. Trends Pharmacol. Sci. 1998. *Receptor and ion channel nomenclature supplement.* Pag 79.
141. Unwin. N. 1993. *Cell.* 72:31-34.
142. Voet, D., y J. Voet. 1992. *Bioquímica.* Omega, Barcelona, 1315 pp.
143. Webb, M., M. Peter y E. Phillips. 1994. *J. Neurochem.* 62:147-1253.
144. Weinstein, I.B., Orenstein, J.M., Gebert, R., Kaighn, E. y Stadler, U.C. 1975. *Cancer Res.* 35, 253-163.
145. Wilson. 1994. *Trends in Cell Biol.* 4:409-414.
146. Wrana, J. L., R. Atisano, F. Wieser y J. Massagué. 1994. *Nature.* 370:341-347.
147. Yaqoob, M., C. R. Snell y G. M. Burgess. 1995. *J. Neurochem.* 65:1290-1295.
148. Yu. S. S., R.J. Lefkowitz y W. P. Hausdorff. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:337-341.
149. Ziemiecki, A., A. G. Harpur y A. F. Wilks. 1994. *Trends in Cell Biol.* 4:207-212.
150. Zhang, J., S. S. Ferguson, L. S. Barak, M. J. Aber, B. Giros, R. J. Lefkowitz y M. G. Caron. 1997. *Receptors and Chanel.* 5:193-199.