



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL
RECEPTOR α_{1b} -ADRENERGICO HUMANO
TRANSFECTADO EN FIBROBLASTOS
MURINOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ANDRES CARLOS GOTTFRIED BLACKMORE



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JESUS ADORF GARCIA SAINZ**

2000

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA



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.



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:

"Caracterización funcional del receptor alfa-1b-adrenérgico humano
transfectado en fibroblastos murinos."

realizado por Andrés Carlos Gottfried Blackmore

con número de cuenta 09653247-0 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Jesús Adolfo García Sáinz

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

Propietario M. en I.B.B. Saúl Cano Colín

Suplente Dra. Sara Frías Vázquez

Suplente Biólogo Miguel Angel Palomino Garibay

FACULTAD DE CIENCIAS
U N . A . M .

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO

A mis padres,
Carlos y Rosemary,
por su inspiración y apoyo incondicional.

A mis hermanos,
Pablo, Roberto y Thomas

A mis abuelos,
Mario y Martha, Robert y Nancy

A Josefina

A mi maestra,
Gurumayi Chidvilasananda,
por darle sentido a mi vida y enseñarme
que nuestra existencia es algo único y precioso.

A todos mis amigos, que tanto quiero y aprecio
y a todas las personas que me han tocado el corazón.

A todos mis compañeros de laboratorio,
Rocío Alcántara, Eréndira Avendaño, Agustín García, Patricia Casas,
Dulce Mora, María Teresa Romero, Luz del Carmen Medina, José Vázquez
y en especial a Maria Elena Torres.

A la Facultad de Ciencias y a
la Universidad Nacional Autónoma de México,
por haberme brindado la oportunidad de estudiar.

A México, que tanto quiero.

Un agradecimiento muy especial al Dr. J Adolfo García Sáinz,
por su visión y confianza en mí, por su apoyo y dirección en este trabajo
y por la transmisión de su valiosa experiencia.

**Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM,
bajo la dirección del Dr. J Adolfo García Sáinz con el apoyo de
CONACyT (27569-N) y DGAPA (IN 200596).**

**“Caracterización Funcional del Receptor α_{1b} -Adrenérgico Humano
Transfectado en Fibroblastos Murinos”**

	Página
I. Resumen.	2.
II. Introducción: Comunicación Celular.	3.
II.1 Mecanismos de Comunicación: Receptores Celulares y Vías de Transducción.	12.
II.2 La Adrenalina como un modelo de mensajero primario.	29.
II.2.1 Síntesis y Metabolismo de las Catecolaminas.	32.
II.3 Receptores Adrenérgicos.	34.
II.3.1 Procesos Fisiológicos en los que intervienen los Receptores Adrenérgicos.	38.
II.3.2 Mecanismos de Acción: Receptores Alfa 1-Adrenérgicos y Vías de Señalización.	42.
II.3.3 Procesos regulativos: Fosforilación y Desensibilización.	51.
II.4 La Transfección como una Herramienta de Estudio.	57.
III. Antecedentes del trabajo Experimental.	59.
IV. Hipótesis.	61.
V. Objetivos.	61.
VI. Diseño Experimental.	62.
VII. Materiales y Métodos.	65.
VIII. Resultados.	69.
IX. Discusión.	82.
X. Conclusiones.	89.
XI. Índice de Tablas y Figuras.	90.
XII. Lista de Abreviaciones.	92.
XIII. Referencias.	93.

Resumen

Los receptores de membrana acoplados a proteínas G son el grupo más grande de receptores celulares que se conocen. De ellos, los adrenérgicos han sido el modelo más estudiado, y son mediadores de varios procesos fisiológicos vitales como la regulación de la presión sanguínea y el ritmo cardiaco. Este trabajo se enfocó al estudio de varios aspectos funcionales y regulativos del receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos. Este estudio funcional es el primero que se reporta para los receptores α_{1b} -adrenérgicos humanos dado que la mayoría de estos estudios se realizan con receptores de roedores. Ante la activación del receptor por el agonista noradrenalina, se observó un incremento marcado en las concentraciones de fosfatos de inositol y Ca^{2+} intracelular. Además, se observó que ésta respuesta era bloqueada por la activación de la proteína cinasa dependiente de calcio (PKC), la cual fosforila al receptor y bloquea su función sin alterar las respuestas mediadas por el receptor a ácido lisofosfatídico. El inhibidor específico de la PKC, Ro-31-8220, y la pérdida de actividad de esta cinasa, inducida por una incubación prolongada de su activador, el PMA, bloquearon sus efectos sobre las respuestas del receptor adrenérgico. Se concluyó que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos se encuentra acoplado, principalmente, a la vía de señalización de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , mediada por las proteínas de la familia Gq y que se encuentra bajo la regulación de la proteína cinasa C. Además, que la molécula exhibe un comportamiento similar al receptor de hámster, lo que abre posibilidades de comparación y extrapolación entre ambos receptores.

II. Introducción: Comunicación Celular.

El siglo veinte ha sido denominado como el siglo de la ciencia debido al increíble desarrollo y descubrimientos que la tecnología ha permitido. En este sentido, el campo de la biología celular ha provisto de un contexto para muchos avances en nuestra concepción del funcionamiento de los seres vivos, y probablemente, lo siga haciendo en años por venir. Una de las teorías más innovadoras y fértiles de la Biología es la de la comunicación celular. De hecho, el concepto y los modelos que se han propuesto a partir de sus postulados, han rebasado las fronteras convencionales de las áreas neural y hormonal, en las cuales se originó, provocando así una turbulenta encrucijada conceptual y metodológica en la biología contemporánea (Valverde, 1997).

Los sistemas celulares se encuentran en un constante intercambio de materia y energía con su entorno. En los metazoarios, las células requieren procesar, elaborar, almacenar, codificar, transmitir y recibir información, para establecer la homeostasis que les permita formar parte de un organismo multicelular con toda su complejidad. Existen varios estudios y modelos que han llevado a reconocer que, en todos los sistemas vivos, la presión evolutiva ha preservado un conjunto, relativamente amplio, de estrategias y mecanismos de comunicación intercelular e intracelular, cuyo denominador común es la quimiotransmisión o transmisión química. La transferencia de información mediante moléculas específicas es una forma universal de comunicación biológica y opera en todos los niveles de comunicación celular estudiados hasta la fecha (Valverde, 1997).

Las principales estrategias de comunicación celular se comparten a lo largo de la escala filogenética y además se sabe que los mensajeros químicos no son exclusivos de un solo organismo o tipo celular particular. Por ejemplo, se reconoce a los sistemas nervioso, inmune y endocrino, considerados en un principio que funcionaban de manera independiente, conformando un continuo de comunicación común a todos los organismos que los presentan.

Para que se lleve a cabo la comunicación celular es necesaria la existencia de mensajeros químicos y moléculas receptoras. Estos receptores deben ser capaces de

identificar a los mensajeros químicos y llevar a cabo alguna interacción física y/o química con ellos. Desde 1905, Langley introdujo el concepto de las moléculas receptoras, siendo un evento importante en el entendimiento de la comunicación celular. Estos receptores deben ser específicos para cada tipo de mensajero químico existente. Las células portadoras de estas moléculas son llamadas células blanco, pues son las que serán estimuladas por la presencia del mensajero químico. Además, las células requieren de moléculas llamadas efectoras para llevar a cabo la respuesta intracelular. Así, la transmisión de información ocurre a través del mensajero químico, el receptor y su(s) efector(es). Existen muchos tipos de mensajeros químicos que se clasifican dependiendo de su naturaleza y estructura química, de su lugar de origen, por sus efectos y por sus mecanismos de acción. (Tabla 1).

Tabla 1: Algunos tipos de mensajeros químicos, clasificados de acuerdo a su naturaleza y estructura química, su lugar de origen, sus efectos y a sus mecanismos de acción.

Hormonas	Origen	Efectos Principales
Polipeptídicas		
Factor liberador de gonadotropinas	Hipotálamo	Estimula liberación de gonadotropinas (FSH y LH).
Factor liberador de corticotropinas	Hipotálamo	Estimula liberación de la hormona Adrenocorticotrópica (ACTH).
Factor liberador de tiotropinas	Hipotálamo	Estimula liberación de tiotropina.
Somatostatina	Hipotálamo	Inhibe liberación de hormona de crecimiento.
Hormona adrenocorticotrópica	Adenohipófisis	Estimula secreción de adrenocortico-esteroides.
Somatotropina (hormona del crecimiento)	Adenohipófisis	Estimula el crecimiento y secreción de somatomedinas.
Vasopresina	Neurohipófisis	Estimula la reabsorción de agua en riñón y aumenta la presión sanguínea.
Insulina	Páncreas	Estimula la absorción de glucosa, síntesis de proteínas y lipogénesis.
Hormona paratiroidea	Paratiroides	Estimula absorción de Ca^{2+} en el hueso, riñón e intestino.
Calcitonina	Tiroides	Inhibe absorción de Ca^{2+} en hueso y riñón.
Esteroides		
Glucocorticoides	Corteza adrenal	Diferentes efectos sobre metabolismo, disminuyen la inflamación, incrementan

		resistencia a estrés.
Mineralocorticoides	Corteza adrenal	Mantenimiento de equilibrio de sales y agua.
Estrógenos		Regular la maduración y función de órganos sexuales secundarios, particularmente en hembras.
Andrógenos	Gónadas	Regular la maduración y función de órganos sexuales secundarios, particularmente en machos; diferenciación sexual masculina.
Vitamina D	Dieta y sol	Estimula la absorción de Ca^{2+} en intestino, riñón y hueso.
Derivados de Aminoácidos		
Adrenalina	Médula adrenal	Estimula la contracción y relajación de músculos lisos, incrementa ritmo y contracción cardíaca, incrementa presión sanguínea, estimula glucogenólisis en hígado y músculo, estimula la lipólisis en tejido adiposo.
Noradrenalina	Médula adrenal y cerebro	Estimula la contracción arteriolar, disminuye la circulación periférica, estimula la lipólisis en tejido adiposo.
Tiroxina	Tiroides	Estimulación del metabolismo, en general.

A los diferentes mensajeros o moléculas utilizadas en los procesos de comunicación celular se les ha bautizado con diferentes nombres, muchos de los cuales se asociaron al órgano y/o función que permitió su identificación. Por ejemplo, las prostaglandinas primeramente identificadas en el semen, se pensó que provenían de la próstata. Sin embargo, la clasificación más útil y menos confusa ha resultado ser aquella que los agrupa en términos genéricos intentando designar el nivel al que operan: hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, inter-leucinas, linfocinas y componentes de la matriz extracelular para la comunicación intercelular, y segundos y terceros mensajeros para la comunicación intracelular (Valverde, 1997). Los mensajeros químicos también pueden clasificarse farmacológicamente como agonistas, cuando se unen a un receptor y lo activan, antagonistas cuando ocupan a un receptor con alta afinidad e inhiben el acoplamiento de agonistas y, agonistas inversos en donde su unión, además de ocupar al receptor, reducen su

actividad basal. Esta clasificación farmacológica es independiente de si la molécula es natural o sintética.

- Tipos de Comunicación Celular

Al ocurrir la interacción entre los mensajeros químicos con sus receptores, y de los receptores con sus efectores, la célula recibe y procesa un mensaje específico que va a determinar su comportamiento y su función. Existen todo tipo de respuestas celulares y generalmente ocurren más de una, de manera simultánea, ya sea ante un sólo estímulo o ante varios. Además, las respuestas celulares ocasionadas por un estímulo pueden ocurrir en diferentes intervalos de tiempo. Después de haber desencadenado una posible y amplia gama de respuestas en la célula, muchos de los mensajeros químicos de la comunicación celular tienen su efecto final en el núcleo, donde regulan la expresión de diferentes genes. De esta manera, las células responden y se adaptan ante los estímulos que reciben. La comunicación celular ocurre, principalmente, a tres niveles; autocrina, paracrina y endocrina (Alberts, 1994).

La comunicación autocrina es aquella donde los mensajeros químicos producidos por una célula interactúan con los receptores de células de la misma especie, de manera contigua, para ejercer su efecto (**Fig.1**). Como ejemplos de mensajeros químicos autocrinos están la Interleucina-2, la cuál estimula la proliferación de células *T* (Voet, 1995), y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Este tipo de comunicación celular se ha visto que es de gran importancia durante el desarrollo donde, por ejemplo, una vez que una célula ha recibido alguna señal para diferenciarse puede comenzar a secretar mensajeros autocrinos que la mantengan en ese rumbo determinado; la comunicación autocrina también es importante después del desarrollo. En mamíferos adultos, varios tipos de mensajeros químicos como las prostaglandinas, las prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos son producidos a partir de ácidos grasos de 20 carbonos derivados de la membrana celular para estimular la participación de la célula en respuestas inflamatorias y de reparación de daño tisular (Alberts, 1994).

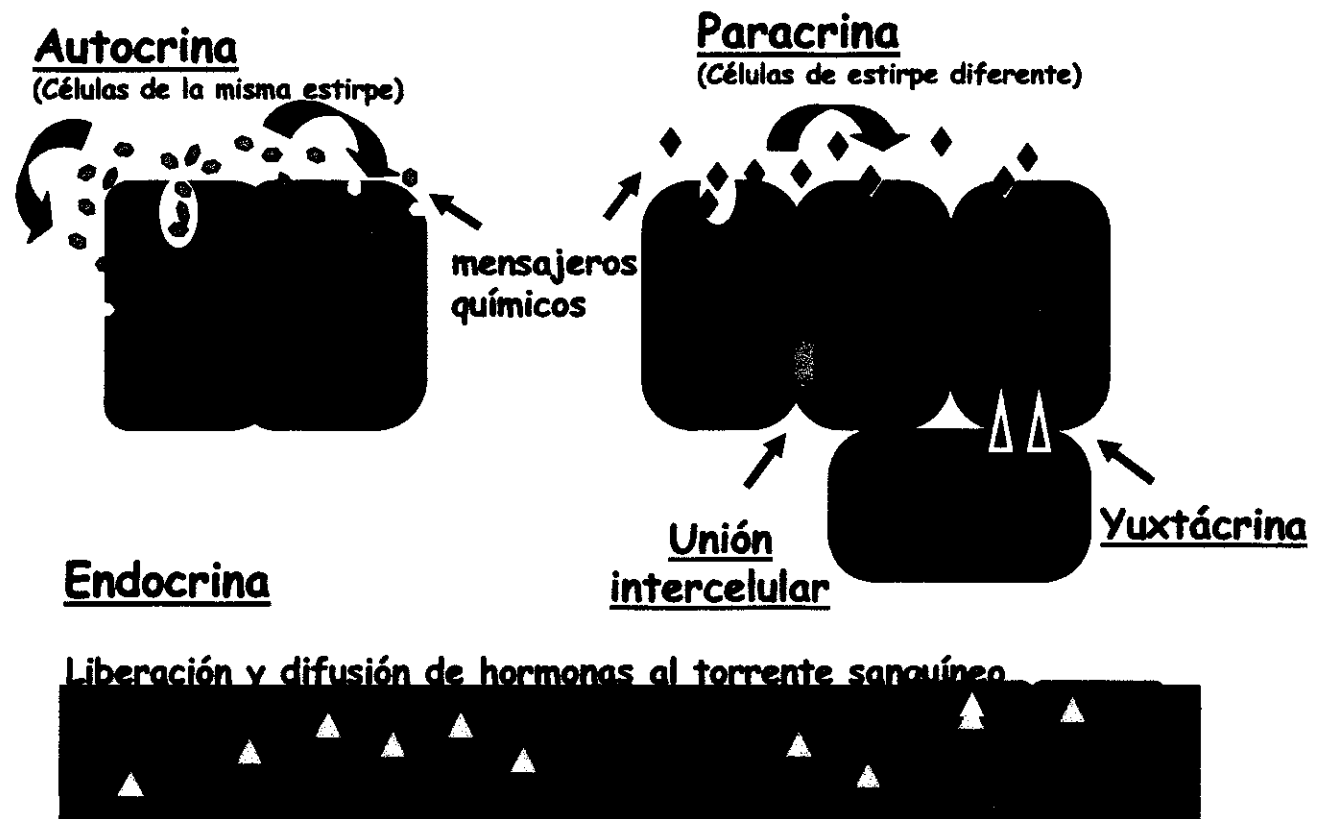


Fig.1 Tipos principales de comunicación celular.

El segundo nivel de comunicación celular es el paracrino. En la comunicación paracrina, las células que secretan mensajeros químicos ejercen efectos sobre las células que están en su cercanía, pero de diferente estirpe (**Fig.1**). Los mensajeros químicos usados para este tipo de comunicación tienen una vida media muy corta, es decir, son degradados rápidamente después de sintetizarse, para evitar que se difundan demasiado lejos de sus células blanco. Como ejemplos de mensajeros paracrinos están las prostaglandinas, la histamina, serotonina, etc. La comunicación paracrina también juega un papel importante en procesos de la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario, como la gastrulación, la inducción de la cresta neural y la diferenciación del ectodermo a tejidos epiteliales a través de mensajeros como el TGF β (factor transformante β del crecimiento), la nogina (Noggin) y la BMP-4 (proteína morfogenética de hueso-4) respectivamente. Es importante mencionar que un mismo mensajero químico puede estar funcionando a los diferentes niveles de comunicación celular.

Para coordinar el comportamiento de todas las células de un organismo multicelular complejo, se requiere de un nivel de comunicación a larga distancia que pueda regular y coordinar las funciones celulares de tejidos y órganos distantes. Para esto evolucionaron dos tipos celulares especializados, las células endocrinas y las células nerviosas (Alberts, 1994). Las células endocrinas producen varios tipos de mensajeros químicos, entre ellos los factores de crecimiento y las hormonas, las cuales son secretadas al torrente sanguíneo y espacios intersticiales para llevar su mensaje a diversos tipos celulares en todo el organismo (**Fig.1**). Las células endocrinas generalmente forman órganos especializados de secreción llamados glándulas que pueden estar distribuidas en el cuerpo regulando diversas funciones (**ver Tabla 2**). Dado que la comunicación endocrina depende de la difusión y del flujo sanguíneo, es relativamente lenta. Además, dado que las hormonas se difunden en toda la sangre y fluidos intersticiales, deben poder ejercer su acción a concentraciones muy bajas (Alberts, 1994). Esto quiere decir que los receptores en las células blanco deben ser muy afines y selectivos para sus ligandos correspondientes.

Tabla 2: Ejemplos de glándulas endocrinas del cuerpo, sus hormonas y funciones.

Glándula Endocrina	Hormonas	Funciones
Hipófisis	Somatotropina; prolactina; tiotropina; adrenocorticotrópina; gonadotropinas (FSH y LH).	Crecimiento; desarrollo de mamas; estimulación de glándula tiroides; estimulación de la corteza de la glándula suprarrenal; estimulación de glándulas sexuales.
Tiroides	Tiroxina y triyodotironina.	Controlar la intensidad del metabolismo de células corporales.
Páncreas (Células β de los islotes de Langerhans)	Insulina.	Regulación de la concentración de la glucosa en sangre.
Suprarrenales	Aldosterona; cortisol; andrógenos débiles, progesterona y estrógenos.	Regular equilibrio sódico y potásico en el cuerpo; anabolismo de proteínas a carbohidratos, disminuir volumen de tejidos y órganos linfáticos, suprimir alergias y respuestas inflamatorias; diferenciación sexual.

Las hormonas pueden dividirse por su naturaleza química en tres grupos: hormonas polipeptídicas, hormonas esteroideas y hormonas análogas de aminoácidos (Kaufman, 1983). Las proteicas y las derivadas de aminoácidos, en particular las catecolaminas, funcionan de manera similar; después de interactuar con su receptor en la membrana celular, desencadenan la producción intracelular de segundos mensajeros como el AMP cíclico y el ion calcio, y terceros mensajeros como los productos de la expresión de proto-oncogenes, los cuales activan a una serie de proteínas catalíticas (efectores). Todos en conjunto llevan a cabo las funciones reguladoras de la hormona (Fig.2). Ejemplos de estas hormonas son la insulina y la serotonina. Por otra parte, las hormonas esteroideas, derivadas de los ácidos grasos, y las hormonas tiroideas, derivadas de aminoácidos, funcionan principalmente asociándose a receptores que se localizan dentro de la célula, formando un complejo activo que se traslada al núcleo y que tiene un efecto directo sobre la expresión génica de la célula (Fig.2). Ejemplos clásicos de estas hormonas son la testosterona, la vitamina D y la L-tiroxina (T₄).

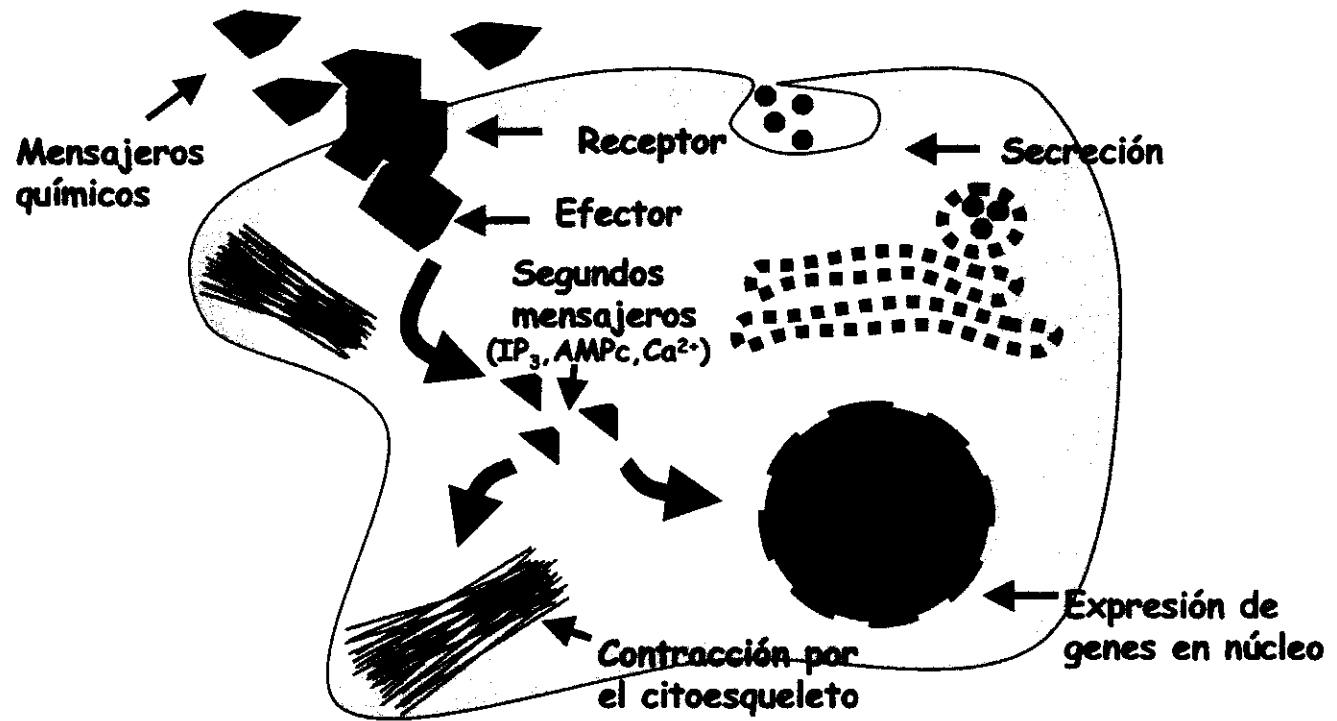


Fig. 2 Sistema de comunicación celular: Un mensajero químico activa a un receptor, este activa a un efector, y éste a su vez produce segundos y terceros mensajeros que modulan procesos celulares como metabolismo, contracción, secreción y expresión de genes en el núcleo.

Las células nerviosas o neuronas son células muy especializadas. Éstas, ejercen su función a través de la comunicación sináptica que ocurre por medio de la transmisión de señales eléctricas en la membrana celular y a través de mensajeros químicos, llamados neurotransmisores, que modifican la permeabilidad de la membrana y modulan su capacidad de transmisión eléctrica. La interacción entre los neurotransmisores secretados por una neurona y sus receptores en otra neurona se realiza a través de una estructura funcional llamada sinapsis. La comunicación de este tipo es considerada por algunos como una modalidad de la comunicación paracrina. La comunicación nerviosa es de las más rápidas que existen. Las neuronas transmiten información por impulsos eléctricos que pueden viajar largas distancias, a velocidades de hasta 100 metros por segundo (Alberts, 1994). Por esto podemos mandar una señal nerviosa desde nuestro cerebro hasta las células de músculo de nuestro pie para mover un dedo en menos de un segundo.

Existen otros mecanismos ampliamente utilizados en los organismos multicelulares para comunicar a sus células; como la comunicación celular por uniones intercelulares y la comunicación yuxtacrina (García-Sáinz, 1998). En la primera, dos o más células se encuentran ligadas por uniones especializadas, llamadas uniones en hendidura (gap) o plasmodemas (en las plantas). Éstas ocurren entre dos células vecinas que han fusionado sus membranas formando canales que conectan sus citoplasmas (**Fig.1**) A través de estas uniones o plasmodemas las células pueden intercambiar mensajeros químicos pequeños, como el AMP cíclico ó el ion calcio, y otras sustancias tales como nutrientes. Como en la comunicación autocrina, se piensa que la comunicación a través de estas uniones es importante en el desarrollo, ayudando a células de la misma estirpe a coordinarse en su diferenciación (Alberts, 1994). Además, este tipo de comunicación es importante para los millares de células que agrupan los tejidos y órganos, que deben coordinarse para llevar a cabo su función de manera integrada.

En la comunicación yuxtacrina una célula es estimulada por medio de la interacción de sus receptores con los receptores de otras células o con la interacción de sus receptores con moléculas de la matriz extracelular. Tal es el caso de la migración celular durante el

desarrollo embrionario, donde cada tipo celular diferente migra dependiendo de los receptores que exprese y de la composición de la matriz extracelular.

Los mensajeros químicos de la comunicación celular permiten a un organismo realizar funciones fundamentales tales como el metabolismo, responder a los estímulos externos que recibimos y procesamos a través de nuestros sentidos, seguir varios ciclos, como el ciclo circadiano, y programas, como la diferenciación y maduración sexual; todo lo necesario para el mantenimiento de la homeostasis corporal.

II.1.1 Mecanismos de Comunicación: Receptores Celulares y Vías de Señalización

Como se mencionó antes, la comunicación celular es posible debido a que las células poseen moléculas receptoras, o antena, denominadas receptores, que son capaces de interaccionar de manera específica y afin con sus ligandos. Todos los receptores celulares conocidos son proteínas, compuestos por diferentes dominios proteicos que conforman su estructura y que por ende determinan su función. En general, cada dominio dentro de la proteína está compuesto por una secuencia específica de alrededor de 100 residuos de aminoácidos. Distintos dominios tienen la facultad de llevar a cabo una función estructural o catalítica específica (ver tabla 3). Existen muchos dominios proteicos que son compartidos entre los receptores y las proteínas catalíticas de la señalización celular.

Tabla 3: Principales dominios funcionales encontrados en proteínas y su función

Dominio	Función	Proteínas que lo presentan
PH (dominio homólogo a la proteína plecstrina)	Asociación a membranas y lípidos como el fosfatidilinositol.	RAS-Gap, Sos, PKB, PLC- γ 1.
SH2 (dominio – 2 homólogo a la proteína Src)	Unión a péptidos con temas estructurales (motifs) que contienen fosfo-tirosina.	BTK, Grb-2, STAT, Tensina.
SH3 (dominio – 3 homólogo a la proteína Src)	Unión a péptidos con secuencias ricas en prolina.	Proteína p47 Phox, NCK.
WW	Asociación a péptidos con regiones ricas en prolina y secuencia consenso de X-Pro-Pro-X-Tyr.	YAP, Pin-1, Utrofina y Distrofina.
PDZ	Asociación con los últimos 4-5 residuos del extremo carboxilo de proteínas blanco.	MAGUK's, fosfatasas de tirosina, proteínas adaptadoras: Grip.

Los tipos de dominios que una proteína (receptor o enzima) presenta en su estructura determinarán sus propiedades funcionales. Por ejemplo, muchas enzimas y adaptadores proteicos que contienen un dominio PH son capaces de asociarse a la membrana plasmática (Williams *et al.*, 1999), para ahí realizar su función. Las enzimas que contienen el dominio SH2, como cinasas de tirosina intracelulares de la familia *Src* y proteínas involucradas en la señalización intracelular como la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la subunidad p85 de la cinasa de la posición 3 del fosfatidilinositol (PI3K), las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) y la proteína adaptadora Grb2 (proteína de unión a factores de crecimiento-2), todas son capaces de unirse de manera específica a residuos de tirosina fosforilados, generalmente encontrados en receptores de membrana para factores de crecimiento que han sido activados (Matozaki *et al.*, 1996) y enzimas que han sido fosforiladas como respuesta celular. Existen dominios catalíticos como el de unión a ATP, que cataliza la unión e hidrólisis del nucleótido de adenosina trifosfato (ATP) en las proteína cinasas como la proteína cinasa A (PKA) y los receptores con actividad de cinasa. Se postula que cuando un receptor interactúa con su ligando puede sufrir un cambio en su conformación, lo que activa o inactiva su(s) dominio(s) catalítico(s) o hace que su(s) dominio(s) de unión a otras moléculas sea(n) expuesto(s) u oculto(s).

Los receptores se encuentran en la membrana plasmática y en el interior de la célula, insertados por dominios transmembranales. Todos los receptores intracelulares son proteínas que están estructuralmente relacionadas y funcionan como moduladores de la transcripción génica. Estos receptores se encuentran comúnmente en el citoplasma celular y son activados por mensajeros químicos pequeños de naturaleza hidrofóbica, capaces de penetrar la membrana plasmática. Ejemplos de éstos son el cortisol, los estrógenos, la progesterona, la testosterona, las hormonas tiroideas, los retinoides y la vitamina D. Generalmente, estos mensajeros hidrofóbicos se encuentran asociados a moléculas acarreadoras, lo que les permite difundir a través del torrente sanguíneo y espacios intersticiales.

Al darse la unión entre el receptor intracelular y su ligando, el receptor adquiere una conformación que le permite trasladarse al núcleo celular. Una vez dentro del núcleo,

generalmente se asocian a secuencias específicas del DNA nuclear para modular la transcripción de genes (Alberts, 1994). Las respuestas celulares de este tipo se pueden realizar en dos etapas, en la primera se activa o suprime la transcripción de algunos genes, en la segunda, el producto de los genes activados modula la expresión de más genes secundarios. De esta manera, un solo estímulo puede causar cambios complejos en la expresión génica de las células blanco. De hecho, el complejo proceso de la metamorfosis en los insectos y anfibios está mediado principalmente por este tipo de receptores.

Los receptores de la membrana plasmática son los que se encuentran acoplados a la transducción de señales y a las vías de señalización intracelular. La transducción se refiere a la transformación de energía o de información de una forma a otra. Dado que muchísimas de las hormonas y mensajeros químicos no son capaces de penetrar la barrera hidrofóbica de la membrana celular, requieren de los receptores de la membrana plasmática para recibir su mensaje y traducirlo a un "idioma" que los efectores del interior celular puedan entender. Esto se lleva a cabo de diversas maneras, la principal es la activación de efectores intracelulares que producen nuevos mensajeros químicos intracelulares o segundos y terceros mensajeros. La generación de un segundo mensajero ocasionará la activación de otros efectores, los cuales producirán a un tercer mensajero. Este tercer mensajero activará a otros efectores y así sucesivamente, como un río con varias cascadas, el mensaje original es amplificado dentro de la célula (Fig. 2).

Las nuevas técnicas de DNA recombinante han revolucionado el estudio de los receptores y de las proteínas involucradas en la señalización celular. Dado a que éstas constituyen menos del 0.01% de la masa total de proteína de la célula, ha sido muy difícil su purificación (Alberts, 1994). La clonación de los genes que codifican para las proteínas ha acelerado de manera significativa su caracterización. Al tener estas secuencias es posible aplicar una serie de metodologías que permiten una manipulación muy precisa de los receptores y efectores de una célula. Por ejemplo, se puede sobre-expresar o anular la expresión de alguna proteína involucrada en una respuesta celular y así determinar su función, de qué efectores depende y qué efectores dependen de ella, y las respuestas que está mediando. También es posible expresar un receptor en una célula que naturalmente no

lo posee y estudiar que clase de respuestas que es capaz de inducir en otros tipos celulares, etc.

Una gran contribución de los estudios basados en la clonación y secuenciación de genes ha sido revelar que la gran diversidad de receptores conocidos puede reducirse a un número pequeño de grandes familias de receptores (Alberts, 1994). Por la manera en que funcionan, los receptores celulares de la membrana plasmática se han dividido en tres grandes grupos; los receptores con actividad enzimática, los receptores canal y los receptores asociados a proteínas G heterotriméricas (Alberts, 1994) (Fig.3).

Los receptores con actividad enzimática son proteínas integrales de membrana que poseen un dominio extracelular de unión a su ligando, un dominio transmembranal y un dominio citosólico, o intracelular, que tiene actividad enzimática intrínseca, ó que en algunos casos sirve para la unión, y activación subsiguiente, de otras enzimas. Se reconocen cinco clases de estos receptores (Alberts, 1994), de los cuales los que poseen actividad de cinasa de tirosina han sido los mejor estudiados. Al unirse a su ligando y activarse, éstos receptores se asocian en pares o dímeros, los cuales se autofosforilan en varios residuos de tirosina de sus dominios intracelulares o fosforilan a otras proteínas directamente. Los sitios de tirosina fosforilados entonces sirven de puntos de anclaje y activación para otras enzimas, vía sus dominios SH2, como las SMAD, que participan en la vía de señalización y propagación del mensaje hacia el interior de la célula. Estos receptores tienen un efecto directo sobre el ciclo celular, síntesis de DNA y citocinesis (Yarden y Ullrich, 1988). La proliferación celular es regulada a través de los factores de crecimiento y otros ligandos mitogénicos, los cuales, a través de estos receptores, activan las vías de señalización intracelular moduladas por los miembros del grupo de las MAP cinasas.

Los receptores canal se encuentran insertados en la membrana plasmática y en la membrana de los diferentes organelos intracelulares. Son proteínas integrales de la membrana y funcionan como canal permitiendo el paso de iones, como el cloro (Cl⁻) o el sodio (Na⁺), a través de ella (García Sáinz, 1998). Los canales que forman, están conformados por proteínas llamadas porinas, y en general, son selectivos y permanecen

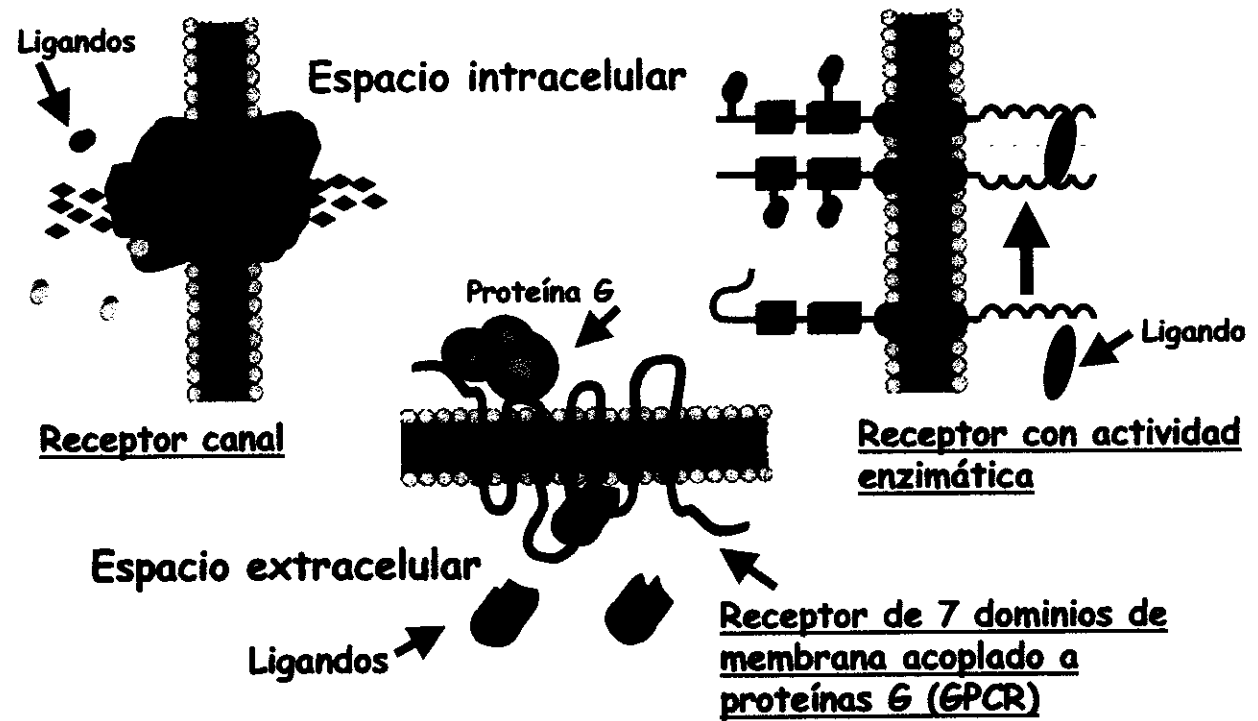


Fig. 3 Tres tipos de receptores en la membrana plásmica: receptores canal, GPCRs y receptores con actividad enzimática.

cerrados a menos que reciban alguna señal para abrirse (Alberts, 1994). Los estímulos principales que activan la apertura de estos canales son el voltaje a través de la membrana, un estrés mecánico o la unión de algún ligando. Casi todos los ligandos extracelulares son neurotransmisores, como el ácido gama-amino butírico (GABA) y la acetilcolina, y los ligandos intracelulares generalmente son iones, como el Ca^{2+} , o nucleótidos, como el AMP cíclico. Estos canales son necesarios en la transmisión sináptica de las células nerviosas ya que transducen los estímulos químicos en mensajes eléctricos. Sin ellos, no sería posible la comunicación neural, dado que regulan la hiperpolarización y despolarización electroquímica de la membrana plasmática. Además, estos receptores son mediadores importantes de varias respuestas fisiológicas como la contracción y relajación del músculo esquelético y de respuestas celulares y vías de señalización intracelular, como el caso de la liberación y el flujo del calcio intracelular.

- Receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G

Los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPCRs del inglés: G-protein coupled receptor) componen al grupo más grande de receptores extracelulares de membrana. Su familia está compuesta por más de 1000 receptores diferentes que median funciones fisiológicas diferentes. Están conformados por siete dominios transmembranales de alfa-hélice, cada uno de 20 a 25 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, alternados por tres asas extracelulares y 3 intracelulares, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular (Fig. 4). Existen un gran número de estímulos incluyendo la luz, sustancias odoríferas, neurotransmisores, hormonas y polipéptidos, que son capaces de activar e inducir cambios en su conformación, en los dominios de alfa-hélice, que resultan en su activación (Ullrich, 1999). Los GPCRs tienen su sitio de unión al ligando en el extremo amino extracelular cuando se trata de ligandos grandes como proteínas. Cuando el ligando es pequeño, como la adrenalina, el receptor presenta dominios de unión pequeños, generalmente formados en el plano de la membrana por varios de los dominios transmembranales de alfa-hélice (Alberts, 1994). El receptor α_{1b} -adrenérgico humano, que es objeto de estudio de esta tesis, forma parte de este grupo de receptores.

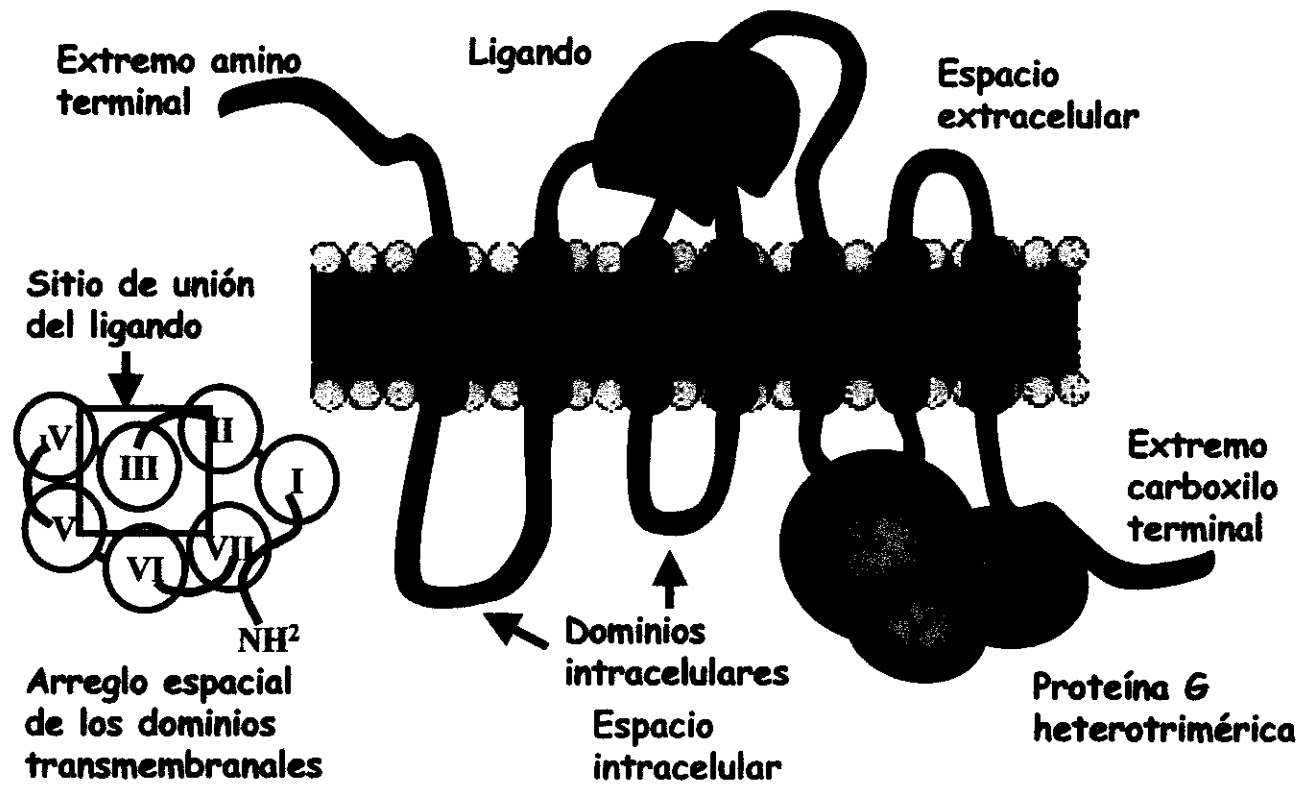


Fig. 4 Esquema de un GPCR. (Basado en García-Sáinz, 1995)

- Proteínas G

Al activarse un GPCR por la unión de su ligando, se favorece el acoplamiento de una proteína G a sus asas intracelulares. Las proteínas G son las encargadas de transmitir el mensaje recibido por el GPCR hacia el interior celular. Existen 2 tipos de proteínas G (proteínas de unión a nucleótidos de guanina): las monoméricas y las heterotriméricas. Las heterotriméricas son las únicas que están asociadas a la transducción de señales por receptores de siete dominios transmembranales. Éstas están conformadas por tres subunidades diferentes, una α ($G\alpha$) y un dímero β - γ ($G\beta\gamma$). La subunidad $G\alpha$ une al nucleótido de guanosina trifosfato (GTP) y cataliza su hidrólisis a GDP mientras que el dímero $G\beta\gamma$ funciona como un activador de otras enzimas (Hamm y Gilchrist, 1996). Éstas proteínas ubicuas, junto con las proteínas monoméricas de unión a GTP como Ras, Rho, Rab y Ran, forman parte de una súper familia de proteínas GTPasas (que unen e hidrolizan GTP). Todas, juegan un papel importante en la regulación del crecimiento, morfogénesis, movilidad celular, dirección de crecimiento axonal, citocinesis, y el tráfico de moléculas a través del núcleo, aparato de Golgi y endosomas (Exton, 1998). Al darse la activación de los GPCRs por la unión de su ligando, la subunidad $G\alpha$ unida a GTP y el complejo $G\beta\gamma$ inician respuestas de señalización intracelular al modular la actividad de receptores canal y de moléculas efectoras específicas como adenilato ciclasas, fosfolipasas C y varias cinasas intracelulares (Ullrich, 1999).

Las proteínas G heterotriméricas se encuentran en un ciclo donde pasan de un estado inactivo a un estado activado (Kleuss *et al*, 1993) (Fig. 5). Al estar inactiva, la proteína G se encuentra como un trímero, $\alpha_{GDP}\beta\gamma$, donde la subunidad $G\alpha$ está unida a GDP (guanosín difosfato) y a la subunidad $G\beta\gamma$. Al activarse un GPCR, sufre un cambio conformacional ocasionando la unión de la proteína G, generalmente con la tercera asa intracelular y con el extremo carboxilo terminal. Al ocurrir este acoplamiento, la subunidad $G\alpha$ pierde su afinidad por GDP y aumenta su afinidad por unir GTP. Al darse la unión de GTP, el trímero se disocia del receptor activado y la subunidad α_{GTP} se separa del dímero $G\beta\gamma$ (Fig. 5). Entonces ambas subunidades quedan libres para interactuar y activar a muchos efectores intracelulares. Después de su interacción con algún efector, la

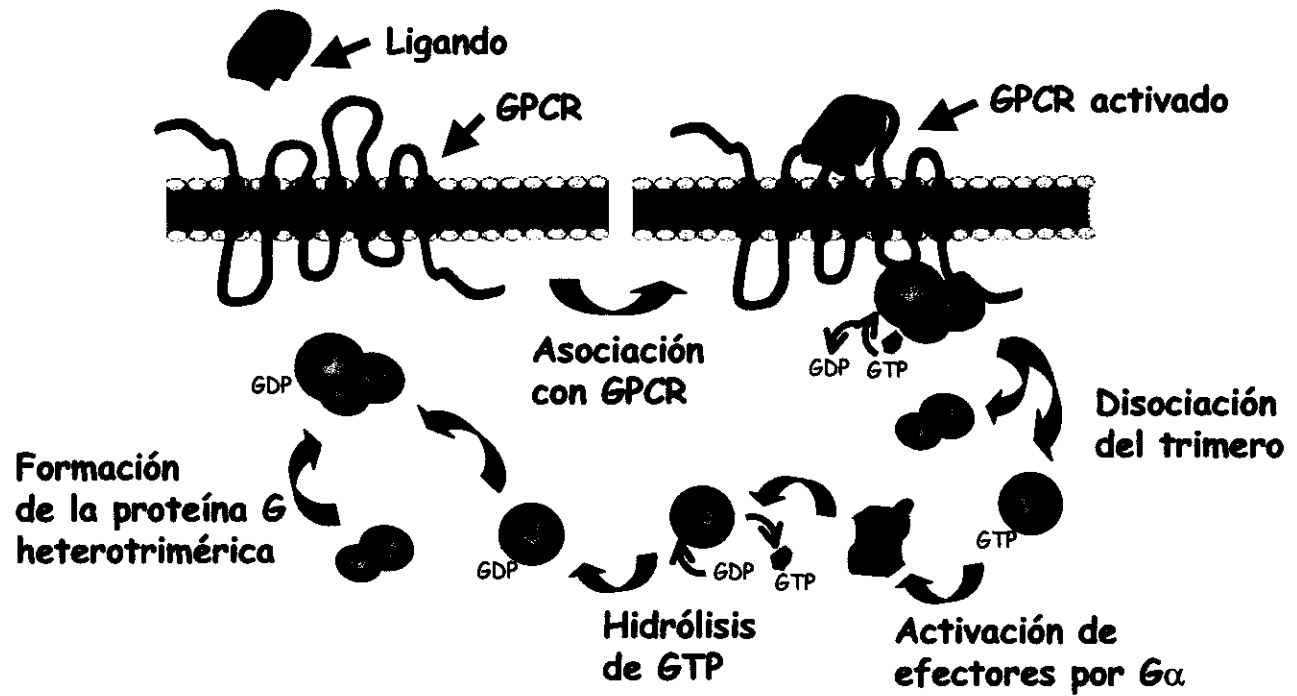


Fig. 5 Al activarse un GPCR, las proteínas G heterotriméricas pasan por un ciclo de asociación y disociación.

subunidad $G\alpha$ hidroliza el GTP y lo convierte en GDP. La subunidad $G\alpha_{GDP}$ se vuelve, nuevamente, más afín por la subunidad $G\beta\gamma$ y se vuelven a asociar en un trímero inactivo.

Después de su activación y de la separación de una proteína G activada, los GPCRs pueden fosforilarse por enzimas cinasas específicas para GPCRs (GRKs – del inglés: G-protein coupled receptor kinase) o por cinasas activadas por segundos mensajeros. Esta fosforilación puede ocurrir en su extremo carboxilo o en asas intracelulares y ocasiona la desactivación del receptor en un proceso llamado desensibilización.

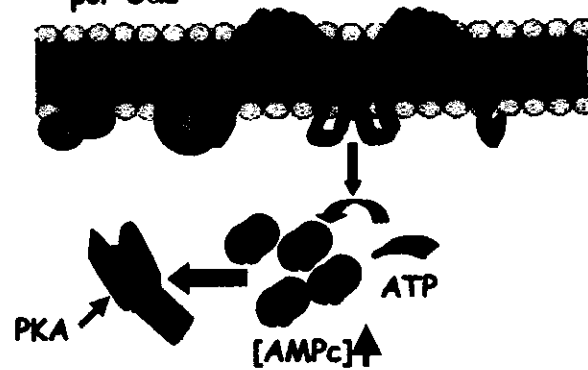
- Principales vías de transducción de las proteínas G heterotriméricas

La mayoría de los GPCRs transmiten su mensaje por la activación de efectores que generan segundos mensajeros, vía proteínas G, los cuales son encargados de modular la actividad de proteínas selectas dentro de la célula. Algunos de los mediadores intracelulares más ampliamente utilizados por los GPCRs son el nucleótido 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPC), el inositol trifosfato (IP_3) y el ion Ca^{2+} . Su concentración puede estar regulada por distintas vías de transducción en casi todas las células animales y la mayoría de los GPCRs regulan una vía ó varias a la vez (Alberts, 1994). Las proteínas G heterotriméricas han sido clasificadas en tres familias principales, G_s , G_i , y $G_{q/11}$ dependiendo de los efectores con los que interactúan, las vías de señalización que desencadenan y su sensibilidad a toxinas bacterianas. Las dos vías principales son las del AMPC o vía de la adenilato ciclasa, y la del IP_3/Ca^{2+} también conocida como la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .

La vía de señalización de la adenilato ciclasa esta modulada por las proteínas G_s y G_i (Fig. 6). Posterior a su activación, las proteínas G_s (del inglés G-stimulating*) se disocian del receptor y activan a una enzima asociada a la membrana, la adenilil ciclasa*, la cual cataliza la producción del segundo mensajero AMP cíclico a partir de ATP. Los receptores β -adrenérgicos median sus funciones principalmente por G_s . Al activarse la adenilato ciclasa, aumentan los niveles intracelulares de AMPC lo que conlleva a la activación de la cinasa dependiente de AMPC o protein-cinasa A (PKA).

Vía de G_s

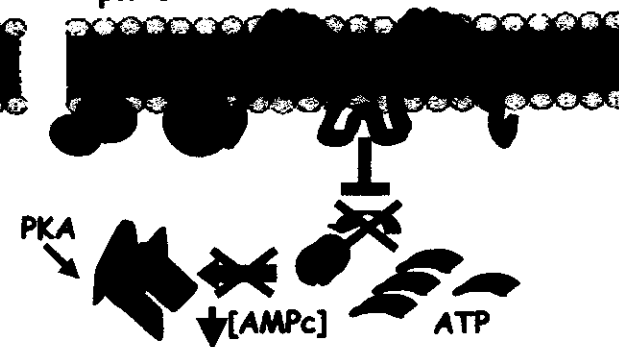
Activación de la adenilato ciclasa por G_s



Aumento de [AMPc]_i y activación de PKA

Vía de G_i

Bloqueo de la adenilato ciclasa por G_i



Bloqueo en el aumento de [AMPc]_i sin activación de PKA

Fig. 6 Vías de transducción de la adenilato ciclasa mediadas por proteínas G heterotrómicas.

El efecto opuesto es mediado por las proteínas G_i (del inglés G-inhibitory) que disminuyen los niveles de AMPc intracelular (Fig. 6). Después de activarse un GPCR acoplado a G_i , ambas subunidades, $G_{i\alpha}$ y $G_{\beta\gamma i}$, inhiben la producción de AMP cíclico. La $G_{i\alpha}$ inhibe a varios tipos de la adenilato ciclasa probablemente uniéndose directamente a su dominio catalítico (Hurley, 1999). La $G_{\beta\gamma i}$ lo hace tanto uniéndose directamente a la enzima, inactivándola, o al unirse con subunidades $G_{s\alpha}$. Los niveles de AMPc disminuyen porque no hay suficiente actividad de la adenilato ciclasa para compensar con la degradación normal de la molécula en la célula.

El AMPc es un segundo mensajero de gran importancia pues regula respuestas celulares de toda clase en los varios tejidos y órganos del cuerpo (ver tabla 4). De hecho, el descubrimiento del 3',5'-AMPc a fines de los años 50's por Sutherland y sus colaboradores fue el evento que desencadenó el paradigma actual de la señalización hormonal por segundos mensajeros (Hurley, 1999).

Tabla 4: Efectos mediados por el AMPc.

Efecto Fisiológico	Hormona mediadora
Síntesis y secreción de hormona tiroidea	TSH
Secreción de progesterona en ovarios	Hormona luteinizante
Degradación de glicógeno en músculo	Adrenalina
Degradación de glicógeno en hígado	Glucagon
Reabsorción de agua en riñón	Vasopresina

El aumento del AMPc intracelular conduce a la activación de la PKA (Fig. 6). La PKA es una cinasa que fosforila residuos de serina y de treonina en las proteínas cuya actividad modula y se encuentra expresada en todas las células animales, probablemente siendo la proteína principal mediando los efectos del AMPc (Alberts, 1994). La PKA fosforila toda clase de sustratos, los cuales varían en cada tipo celular, lo que explica las diferentes respuestas por el incremento de AMPc en cada tipo celular (ver tabla 4). La PKA es capaz de inducir respuestas tan variadas como la expresión de genes y la regulación de los niveles de glucosa en músculo esquelético.

Dado que el AMPc y su efector, la PKA, ocasionan respuestas tan marcadas e importantes en la célula, es crucial que sus efectos sean transitorios. De hecho, muchas enfermedades son ocasionadas por la activación constante de la adenilato ciclasa. Tal es el caso del cólera causado por la bacteria *Vibrio cólera*. Esta bacteria produce una toxina, la toxina del cólera, que es una enzima que modifica a las subunidades G_{sa} y no les permite hidrolizar al GTP. El resultado es la activación constante de la adenilato ciclasa. Los niveles altos, por tiempo prolongado, de AMPc en las células de la mucosa intestinal ocasionan la salida de Na^+ y evitan la reabsorción intestinal de agua, lo que causa la diarrea característica de esta enfermedad (Kaufman 1983; Alberts, 1994).

Las proteínas $G_{q/11}$ son mediadoras de la vía de activación de la fosfolipasa C- β conduciendo a la producción de los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) y fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato (IP3), el cual conduce a la liberación de Ca^{2+} intracelular. Esta vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} es la que está asociada a los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos. Las proteínas de la familia G_q se encuentran expresadas en todos los tejidos de un mamífero. Se diferencian de las otras proteínas G heterotriméricas en que en el extremo carboxilo de la subunidad $G_{\alpha q}$ no poseen el residuo de cisteína que es sustrato de la inhibición por la toxina pertussis (Exton, 1994), que proviene de la bacteria de la tosferina *Bordetella pertussis*; ni el residuo de arginina que es sustrato de la toxina del cólera. Dado que esta vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} es la que está asociada a los receptores $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgicos se detallará sobre ella cuando se hable sobre los mecanismos de acción de estos receptores.

- Regulación de la comunicación celular

La comunicación celular debe estar muy bien coordinada para que los millones de células de un organismo funcionen de manera organizada. Para esto existen diversos procesos regulativos que modulan la intensidad y la duración de las respuestas celulares que son ocasionadas por las señales que las células constantemente transmiten y reciben. Si nos detenemos a pensar, la comunicación celular puede regularse principalmente a tres niveles. El primero es modular la producción y secreción de los mensajeros químicos. El segundo

es regular la expresión, afinidad y función de los receptores celulares. El tercero, una regulación similar a la anterior, donde se modula la función, la afinidad ó especificidad y la expresión de los efectores celulares.

Dado que la mayoría de las hormonas y los mensajeros químicos tienen receptores en un rango amplio de tipos celulares, no sería prudente para el organismo dejar de producirlos en su totalidad, pues en el intento de regular una respuesta celular, se estarían bloqueando o aumentando otras. Dentro de la célula, aunque la mayoría de los efectores celulares son compartidos por las diversas vías de señalización, es posible regular su efecto. Por ejemplo, el efecto de fosforilación por las proteínas cinasas, como la PKA y la PKC, es contrarrestado por proteínas fosfatasas. Éstas, hidrolizan los enlaces ester liberando los grupos fosfato de los aminoácidos fosforilados. De hecho, para cada tipo de proteína cinasa que se conoce en la célula, existen proteínas fosfatasas que antagonizan su actividad. Existen cuatro tipos de fosfatasas de serina y treonina que regulan la actividad de las cinasas de serina y treonina. Estas son la fosfatasa 1, 2A, 2B y 2C. Un mecanismo alterno de regular a los efectores intracelulares es la retroalimentación negativa por sustrato, donde la actividad de enzimas es regulada por sus productos. Tal es el caso de algunas enzimas claves de procesos metabólicos como la glucólisis y la fosforilación oxidativa.

Sin embargo, la mayor parte de la regulación en la comunicación celular ocurre al nivel de los receptores celulares. Ésta regulación puede ocurrir a distintos tiempos, principalmente a largo, mediano y corto plazo. A largo plazo esto ocurre al controlar el número y el tipo de receptores que las células están expresando y es un proceso que toma un periodo de horas o días. Los mecanismos a mediano (horas y minutos) y corto plazo (minutos y segundos) no tienen que ver con la regulación genética de los receptores que se expresan, sino en modificar la función y afinidad de los ya presentes.

Un aspecto fundamental de la señalización celular es que después de una estimulación crónica, la célula hace uso de varios procesos regulativos para disminuir su respuesta ante el estímulo constante. En el caso de los receptores acoplados a proteínas G, la interacción con sus agonistas induce la atenuación de la respuesta apenas minutos después de la estimulación. A este proceso se le conoce como desensibilización (Hausdorff

et al, 1990). La fosforilación de proteínas es un evento central de la desensibilización inducida por agonistas, que involucra la participación de cinasas activadas por segundos mensajeros, como la PKA (Hausdorff *et al*, 1989) y la PKC (Houslay, 1992), y de las cinasas de receptores asociados a proteínas G (GRK's) (Lefkowitz *et al*, 1998). La fosforilación en estos receptores es un evento de regulación a corto plazo, pues ocurre apenas pasados algunos minutos (García Sáinz *et al*, 2000) y hace que los receptores pierdan su afinidad hacia sus sustratos y/o hacia sus efectores.

Una vez fosforilados, los receptores entran en un ciclo regulativo de varias fases, un mecanismo a mediano plazo. Este ciclo de regulación se detallará posteriormente cuando se explique la regulación de los receptores adrenérgicos. Brevemente, la fosforilación induce un secuestro rápido de los receptores asociados con proteínas G hacia el interior de la célula, tales como los receptores α y β -adrenérgicos, el receptor para angiotensina y los receptores muscarínicos. Se piensa que estos receptores son llevados a una vía endosomal a través de un proceso de endocitosis mediado por clatrin (Tolbert y Lameh, 1996). Una vez dentro de la célula, los receptores no son capaces de activarse por estímulos externos.

Así podemos ver de manera general que la regulación a corto plazo sirve esencialmente para la terminación de algún estímulo recibido, para desactivar algún receptor que ha sido activado. La regulación a mediano plazo, como lo es la desensibilización y secuestro de los receptores acoplados a proteínas G, es un mecanismo para que las células disminuyan su respuesta ante la presencia constante de un estímulo.

La regulación de muchos receptores y efectores proteicos de la célula también ocurre a largo plazo (horas y días). Un caso común es la pérdida de actividad, conocido comúnmente como "down regulation". Este proceso ocurre cuando un receptor o efector ha sido expuesto a su activador o agonista por un tiempo prolongado (horas). El resultado es que la expresión de dicha proteína es reducida, para que así la célula pueda mantener su funcionamiento normal ante la presencia prolongada del activador o agonista. Los ésteres de forbol son potentes activadores de la PKC. Sin embargo, después de una exposición prolongada, estos activadores inducen que la célula detenga la expresión de la PKC y sufren una depleción de estas cinasas. Un caso similar opera al nivel de los receptores. Así, la

regulación a largo plazo involucra la modificación genética de la expresión en el número y tipo de receptores o efectores que la célula está utilizando para comunicarse.

Las células de distintos órganos son capaces de cambiar la expresión de sus receptores siguiendo un programa de diferenciación o para adaptarse ante los estímulos que están recibiendo. Por ejemplo, se ha visto que la respuesta a la adrenalina en los hepatocitos de rata fetales está mediada por el receptor β -adrenérgico, en la rata joven por los β y α_{1b} -adrenérgicos, y en la rata adulta sólo por los α_{1b} -adrenérgicos (García Sáinz, 1998). La expresión y el número de receptores que una célula o tejido presenten son pues, una condición dinámica que es modulada constantemente por los estímulos extracelulares.

- Amplificación de la señal

Además de su importancia para recibir y comprender las señales que vienen del exterior celular, la transducción de señales tiene un papel fundamental en la amplificación del mensaje hacia el interior de la célula. En el caso de los GPCRs, tan solo la activación de un receptor puede conducir al acoplamiento de varias proteínas G antes de ser fosforilado y desensibilizado. Cada una de las subunidades de cada proteína G activada podrá interactuar y estimular a varios efectores celulares. La producción de segundos mensajeros por todos estos efectores conducirá al aumento de actividad de muchos más efectores. De esta manera, al proseguir la cascada de señalización intracelular, el mensaje original es amplificado enormemente. Lo que la amplificación celular permite son respuestas rápidas que no dependen de que la concentración de hormonas o receptores sea mayor o menor. La amplificación de la cascada de señalización intracelular permite a las células tener un control mucho más fino, mas allá del número de receptores que pueda expresar o de la concentración de hormonas y mensajeros químicos extracelulares presentes.

- Resumen

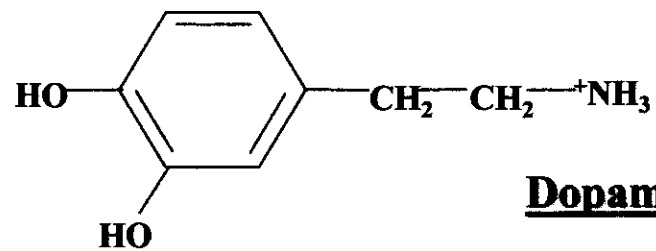
Bajo condiciones normales, una célula presenta distintos receptores y en números variables de ellos, lo que le permite responder y procesar toda clase de estímulos simultáneamente. Las células reciben y procesan los estímulos externos principalmente por medio de tres grandes grupos de receptores, los receptores con actividad enzimática, los receptores canal y los receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas. Una célula

puede responder de maneras diferentes ante el mismo estímulo dependiendo del tipo de receptores que exprese y de los distintos efectores y sustratos intracelulares que posea. Se ha visto que la transducción de señales permite a la comunicación celular compartir un gran número de efectores celulares para la activación de diferentes vías de señalización intracelular y que, además, la cascada de estas señales dentro de la célula conduce a la amplificación del mensaje. El nivel principal al que opera la regulación de la comunicación celular es al nivel de los receptores, tanto en su función, su afinidad y su expresión. De hecho, la expresión diferencial de los receptores celulares es uno de los factores principales que determina como cada tipo celular va a responder ante los estímulos que recibe, por tanto su función.

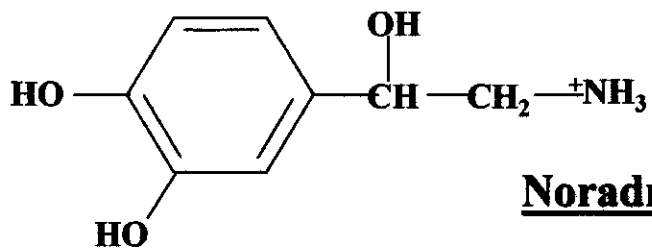
II.2 La Adrenalina como un modelo de mensajero primario.

La adrenalina pertenece a un grupo de biomoléculas llamadas catecolaminas. Las catecolaminas se asemejan a los glucocorticoides y a las hormonas tiroideas en que tienen un efecto directo sobre la mayoría de los tejidos y procesos fisiológicos del cuerpo. A semejanza de las hormonas peptídicas en que inician respuestas fisiológicas al interactuar con receptores de membrana en sus células blanco. Sin embargo, las catecolaminas son diferentes al resto de las hormonas del sistema endocrino, en que su liberación desde las terminaciones de neuronas simpáticas y desde la médula suprarrenal se encuentra controlada directa y exclusivamente por el sistema nervioso central (Landsberg y Young, 1985). Funcionalmente, las catecolaminas son transductores neuroquímicos que convierten la actividad neural eléctrica en una respuesta fisiológica. Los efectos de las catecolaminas son inducidos rápidamente y se disipan pronto, contrario a los efectos más lentos y prolongados de la mayoría de las hormonas. Estos mensajeros químicos son compuestos formados por una amina y un grupo catecol aromático (Fig. 7) y se producen a partir de la descarboxilación del aminoácido tirosina y una serie de reacciones enzimáticas. Las catecolaminas principales son la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina (Fig. 7) y su función principal es modular una serie de procesos fisiológicos actuando como neurotransmisores y hormonas en el cuerpo.

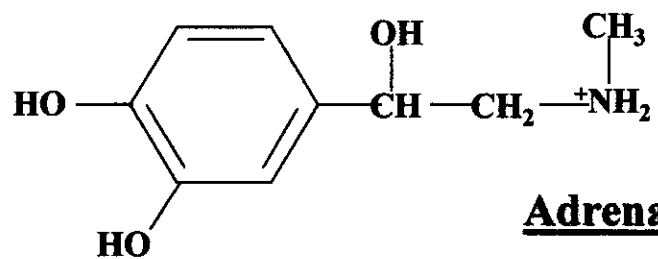
La adrenalina ha sido una de las biomoléculas más estudiadas en las ciencias biomédicas. Hace más de cien años, en 1895, los investigadores Oliver y Schäfer reportaron un compuesto activo en los extractos de médula suprarrenal con la capacidad de producir cambios pronunciados en la fisiología de sus animales y tejidos experimentales. Sus estudios determinaron los efectos fisiológicos predominantes de la adrenalina tales como su acción vasoconstrictora, su efecto positivo inotrópico y cronotrópico sobre el corazón y su capacidad de incrementar la contracción en músculo esquelético (García Sáinz J, 1995). En los años siguientes se dio una carrera por aislar, purificar y caracterizar el compuesto activo. En 1897 John Abel y Crawford, de la Universidad John Hopkins, reportaron el aislamiento del compuesto activo y lo llamaron "epinefrina". Sin embargo, algunos años después, Jokichi Takamine, un investigador japonés-americano, generó un



Dopamina



Noradrenalina



Adrenalina

Fig. 7 Catecolaminas principales. (Tomado de Voet, 1995)

reporte similar donde indicaba que el compuesto aislado por Abel y Crawford no era el compuesto puro sino una mezcla y que a diferencia de ellos, él si había tenido éxito en purificar el compuesto activo de las glándulas suprarrenales, el cual bautizó como "adrenalina". Ambos grupos obtuvieron el crédito por su descubrimiento, ambos aislaron el mismo compuesto, solo que unos en su forma de sal de bitartrato y otros en su forma de ácido. Ambos nombres, epinefrina y adrenalina, se adoptaron para denominar al componente activo de la médula suprarrenal.

Posteriormente, varios investigadores empezaron a observar que los efectos de la adrenalina eran muy similares a los que se presentaban durante la estimulación de los nervios simpáticos. Elliot sugirió que la estimulación de los nervios simpáticos resultaba en la secreción de cantidades minúsculas de una sustancia similar a la adrenalina (García Sáinz J, 1995). Pasaron varios años antes de que se comprobara su hipótesis y lograr determinar que la sustancia secretada por el sistema nervioso era una molécula de la misma naturaleza. Se le llamó noradrenalina o norepinefrina y se le considera como un neurotransmisor, mientras que a la adrenalina o epinefrina se le considera básicamente como una hormona. La noradrenalina y la adrenalina son las dos aminas adrenérgicas naturales que comparten la misma familia de receptores, los receptores adrenérgicos.

Muchos de los estudios posteriores se centraron en la síntesis y secreción de la adrenalina y noradrenalina. También, varios investigadores se enfocaron en cómo ocurría el término de su acción a nivel celular. En diversos tejidos se observó que la recaptura en terminaciones sinápticas era significativa mientras que en otros tejidos se determinó como importante la terminación del efecto adrenérgico por la degradación enzimática y la difusión (García Sáinz J, 1995). Desde su primera caracterización hasta nuestros días, la adrenalina se ha encontrado participando en una gama amplísima de procesos fisiológicos. El estudio de tales acciones representa el esfuerzo de miles de científicos literalmente y sus descubrimientos son de una importancia enorme en nuestro entendimiento de la fisiología y patofisiología, y definitivamente, para la base de intervenciones terapéuticas en la práctica médica de cada día (García Sáinz J, 1995). Por eso, la adrenalina y sus receptores son un modelo de estudio muy importante.

II.2.1 Síntesis y Metabolismo de las Catecolaminas

La epinefrina y la norepinefrina se producen en los tejidos cuyas células poseen las enzimas necesarias para su síntesis. La epinefrina proviene principalmente de las glándulas suprarrenales. Éstas consisten de una corteza externa, que secreta hormonas esteroideas, y de una sección interna ó médula que secreta catecolaminas. La corteza y la médula son consideradas como glándulas endocrinas distintas, independientes en su secreción hormonal y en su función (Kaufman, 1983). La norepinefrina es sintetizada por neuronas adrenérgicas principalmente, que se encuentran en el sistema nervioso autónomo y todo el sistema simpático, particularmente en el locus coeruleus y el sistema límbico del cerebro (Atkins, 1987).

La síntesis de ambos compuestos se basa principalmente en la descarboxilación e hidroxilación del aminoácido tirosina, un aminoácido esencial que adquirimos de la dieta o de la conversión hepática de la fenilalanina. La conversión de este aminoácido aromático a la noradrenalina y adrenalina ocurre en el citoplasma según el siguiente proceso (Fig. 8): a) La tirosina es hidroxilada a *3,4-dihidroxifenilalanina* (L-DOPA) por la enzima *tirosina hidroxilasa*, que requiere de la co-enzima 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina. b) L-DOPA es descarboxilada para formar *dopamina* por una *descarboxilasa de aminoácido aromático*. c) Una segunda hidroxilación sobre la dopamina resulta en la formación de *norepinefrina*. d) La metilación del grupo amino de la norepinefrina por una *S-adenosil-metiltransferasa* (SAM) produce a la *epinefrina*. La hidroxilación inicial de la tirosina es el paso limitante de esta vía biosintética, por lo que la actividad y la expresión de esta enzima son los factores determinantes en la síntesis de catecolaminas.

Después de sintetizarse, la adrenalina es secretada de la glándula suprarrenal para entrar a la circulación sanguínea donde afecta al sistema nervioso autónomo y actúa como mediador de varios procesos fisiológicos. Por tener un grupo metilo de más, la adrenalina no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (Atkins, 1987). Sin embargo, la noradrenalina se sintetiza principalmente en el cerebro, en particular en las neuronas del locus coeruleus y del sistema límbico donde funciona como neurotransmisor. Al ser estimuladas éstas neuronas por alguna señal eléctrica, ocurre una entrada del ion Ca^{2+} al

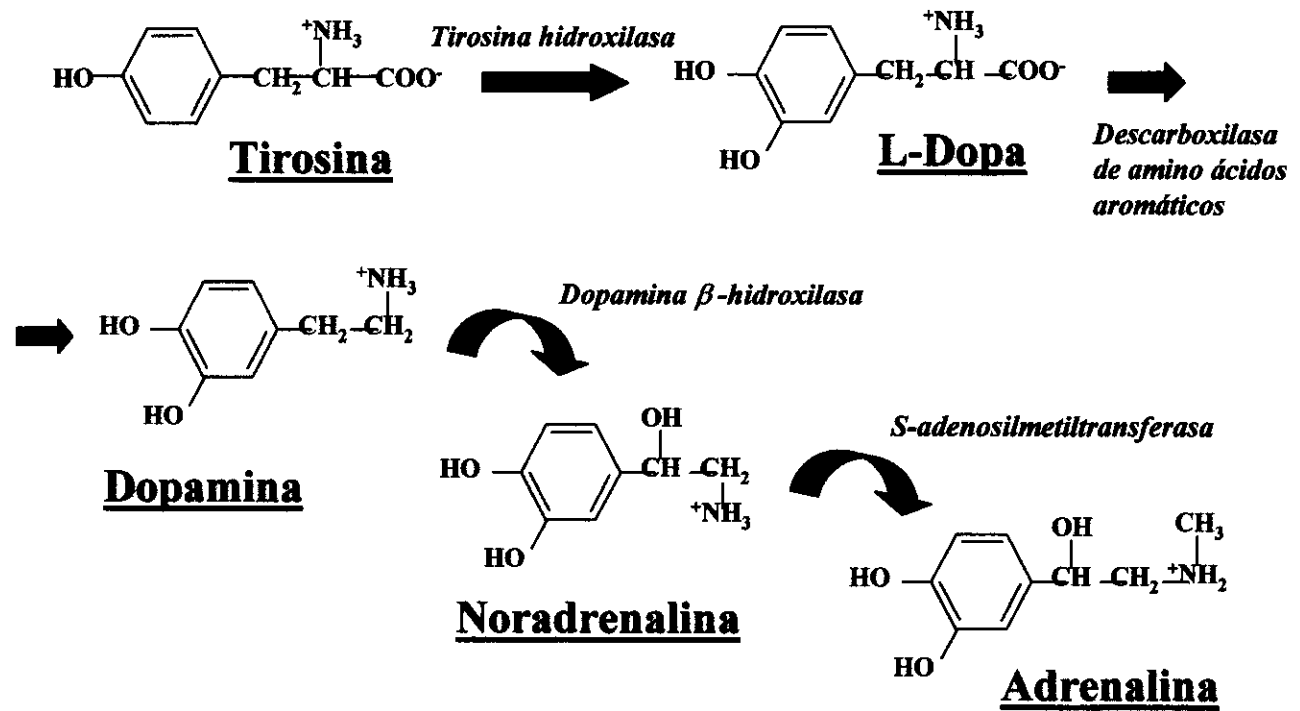


Fig. 8 Vía de síntesis de las catecolaminas. (Tomado de Voet, 1995)

citoplasma de la neurona, a través de canales para Ca^{2+} regulados por voltaje. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promueve la síntesis de la noradrenalina, ya que activa a una cinasa, la CaM II (cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II), la cual fosforila y activa a la tirosina hidroxilasa. El aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ también ocasiona que vesículas intracelulares de secreción se fusionen con la membrana plasmática y así se libera la noradrenalina a los espacios sinápticos, donde ejerce su acción en la estimulación de otras neuronas. La noradrenalina también es secretada al torrente sanguíneo vía este mecanismo. Sabiendo que, tanto la médula suprarrenal como el sistema nervioso central, tienen un mismo origen embrionario, a partir de la cresta neural, no es difícil comprender porque la adrenalina y la noradrenalina poseen funciones similares en el organismo y porque comparten el mismo grupo de receptores celulares.

Después de efectuar la interacción con sus receptores apropiados, la adrenalina y la noradrenalina, como todas las moléculas del cuerpo, son degradadas a moléculas menores, inactivas, que son recicladas y re-utilizadas por el cuerpo. Esto ocurre inicialmente a través de varios mecanismos como la degradación enzimática extracelular, la internalización y degradación intracelular y la recaptura extraneuronal.

II.3 Receptores Adrenérgicos

Existen tres tipos de receptores adrenérgicos: los α_1 , los α_2 y los β . Estos receptores han sido divididos basándose en criterios como su secuencia de aminoácidos, su afinidad por agonistas y antagonistas y porque cada uno activa principalmente una vía de transducción distinta (García Sáinz *et al.*, 2000). Los α_1 están acoplados principalmente a la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} por la proteína $G_{q/11}$. Los α_2 activan la vía inhibidora de la adenilato ciclasa, por asociación a la proteína G_i . Los receptores β se acoplan preferencialmente a las proteínas G_s activando la vía de la adenilato ciclasa y la producción de AMPc. Poco después de haber hecho esta separación a finales de los años 70's y principios de los 80's, se encontró heterogeneidad en estos tres tipos de receptores adrenérgicos y actualmente cada grupo está dividido en tres subtipos; α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} ; α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} ; y los β_1 , β_2 y β_3 . El modelo de los tres tipos de receptores adrenérgicos ha sido

probado en muchos sistemas celulares y parece ser correcto. Sin embargo, la evidencia que se ha encontrado sugiere que está sobre simplificado (García Sáinz, 1995) dado a que se ha visto que un receptor es capaz de asociarse a diferentes tipos de proteínas G y modular diferentes vías transduccionales por varias enzimas y canales iónicos dependiendo del tipo celular en cuestión y de otros factores como incluso la concentración de agonistas presentes.

Todos los receptores adrenérgicos están acoplados a proteínas G heterotriméricas y están conformados por siete dominios transmembranales de alfa-hélice, cada uno de 20 a 25 residuos de aminoácidos hidrofóbicos, alternados por tres asas extracelulares y 3 intracelulares, con un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular (**Fig. 9**). A través de estudios de mutagénesis dirigida y de la formación de quimeras (receptores cuyos dominios han sido substituidos con los de otros receptores) ha sido posible elucidar los sitios de unión y los aminoácidos necesarios para la interacción con la adrenalina. Estos estudios se han llevado a cabo, principalmente, en los receptores β_2 -adrenérgicos. El modelo más aceptado indica que las asas III, IV, V y VI forman un dominio de unión al ligando en forma de bolsa o nido. El residuo de aspartato 113 parece ser de importancia actuando de contra-ión para la carga de la amina de la adrenalina. Los grupos hidroxilo del anillo catecol parecen estar interactuando con residuos de serina en las posiciones 204 y 207 de la quinta hélice transmembranal. Al parecer la interacción hidrofóbica del anillo catecol con el residuo 290 de fenilalanina de la sexta hélice transmembranal es importante también (revisado por García-Sáinz, 1995). Estos estudios también han permitido revelar que la segunda y tercera asa intracelular son críticas para determinar la especificidad de qué tipo de proteína G será la que se acople al receptor. Además, el carboxilo terminal y las demás asas intracelulares también tienen un papel en esta acoplación (revisado por García-Sáinz *et al.*, 1999).

Estos receptores también sufren modificaciones post traduccionales importantes. Cerca de su dominio amino terminal poseen sitios de glicosilación en residuos de asparagina y varios sitios potenciales de fosforilación en sus dominios intracelulares, en

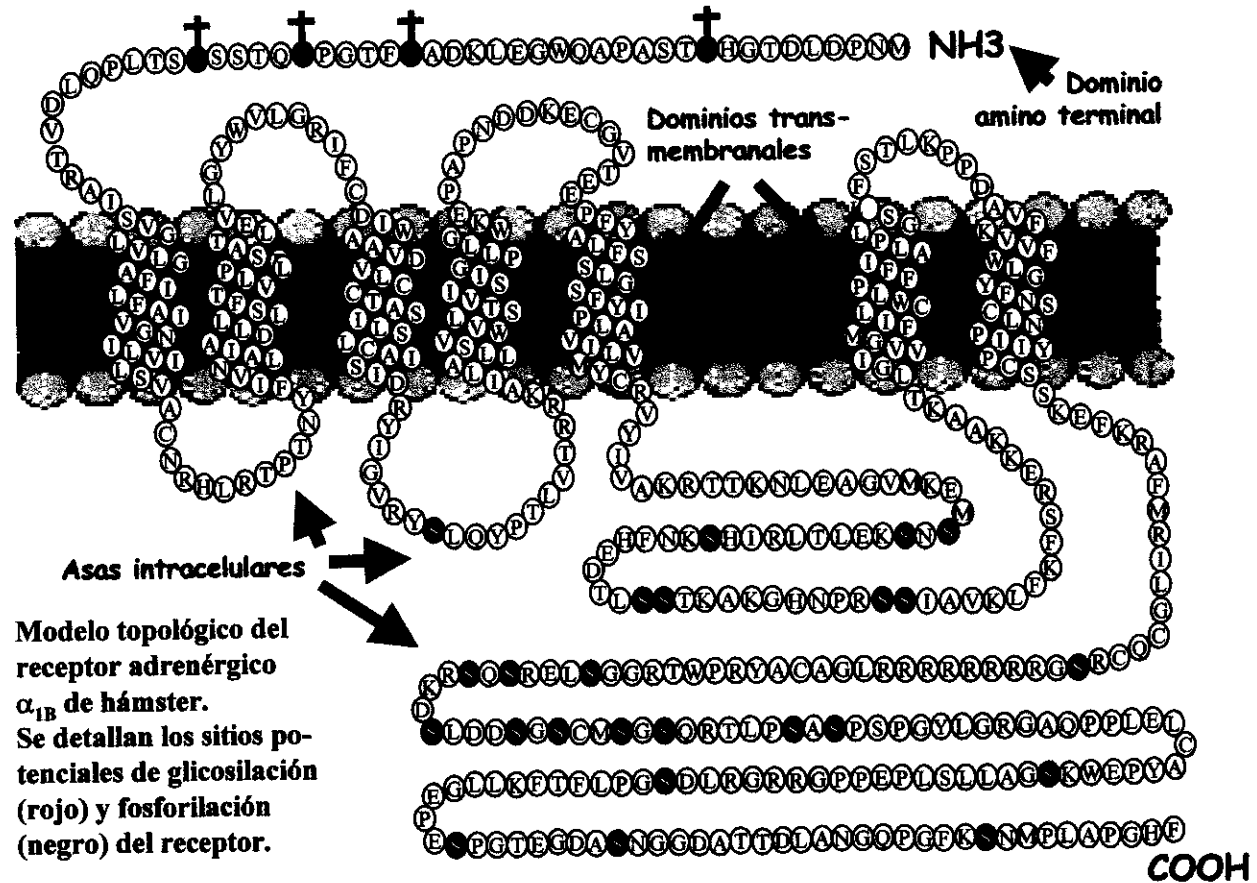


Fig. 9 Esquema detallado de un receptor adrenérgico.

particular en el segmento carboxilo terminal. El estado de fosforilación es uno de los parámetros más importantes que regulan la actividad de los receptores adrenérgicos. Los receptores β -adrenérgicos poseen un residuo de cisteína (cys 341) en el último fragmento intracelular que puede ser palmitoilado (Adam *et al.*, 1999). Este sitio palmitoilado ancla este fragmento de la cola carboxilo a la membrana formando una cuarta asa intracelular. El estado de palmitoilación de estos receptores y de sus respectivas proteínas G se ha considerado como un elemento regulador de su función (Adam *et al.*, 1999). Siempre se ha pensado que estos receptores funcionan como monómeros, un solo receptor interactuando con su ligando para activar sus vías transduccionales. Sin embargo, modelos actuales postulan la posibilidad de que un paso temprano en la señalización de estos sistemas sea la agregación de estos receptores, tal como ocurre en la dimerización de los receptores con actividad de tirosina cinasa. Actualmente, se tiene evidencia de esto para los receptores de la hormona liberadora de gonadotropinas, el receptor GABA_{BR} (Jones *et al.*, 1998; White *et al.*, 1998) e incluso para los receptores adrenérgicos (revisado por García Sáinz *et al.*, 1999b).

- Receptores α_1 -Adrenérgicos

Como se mencionó anteriormente, estos receptores se han dividido en tres subtipos, α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} ; aunque estudios recientes han propuesto la existencia de variantes de escisión y empalme de exones (splicing) para algunos de estos, en especial del α_{1A} , y un nuevo subtipo, el α_{1L} , basándose principalmente en afinidades por ligandos como la prazosina (revisado por García Sáinz *et al.*, 1999b). Los tres subtipos, cuyos genes han sido clonados, son capaces de activar la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , aunque se ha observado que existen diferencias en su eficacia para producir la respuesta intracelular. Pareciera que los α_{1A} tienen la mayor eficiencia, después los α_{1B} y los menos eficientes siendo los α_{1D} . Otras diferencias entre estos receptores radican en su capacidad de asociación con proteínas G de la familia $G_{q/11}$ y proteínas G sensibles a la toxina pertussis. Además, se distinguen en su susceptibilidad a ser regulados, por la fosforilación de cinasas intracelulares de serina y treonina (Vázquez-Prado y García Sáinz, 1996). El receptor α_{1B}

de hámster fue el primero de este grupo en ser clonado, ha sido el más estudiado y se considera prototípico de este grupo.

Los receptores adrenérgicos se encuentran expresados en la mayoría de las células del cuerpo humano. Estudios de detección de los RNA mensajeros y de los α_1 -adrenérgicos de membrana demuestran que existe una localización diferencial de cada subtipo en distintos órganos y tejidos. En el hombre, los receptores α_{1A} predominan en el hígado, corazón, cerebelo, corteza cerebral y próstata. El mRNA del α_{1B} se encuentra en altas concentraciones en el bazo y riñón, mientras que el del α_{1D} se encuentra preferencialmente localizado en la aorta (revisado por García Sáinz *et al*, 1999). Sin embargo, es importante mencionar que la detección de los niveles de los mRNA no necesariamente refleja la expresión de los receptores ni su predominancia funcional.

II.3.1 Procesos Fisiológicos en los que intervienen los Receptores Adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos se encuentran mediando las acciones de la adrenalina y la noradrenalina en el cuerpo, principalmente sus efectos fisiológicos predominantes como su acción vasoconstrictora, su efecto positivo inotrópico (fuerza de contracción) y cronotrópico (contracciones por unidad de tiempo) sobre el corazón y su capacidad de incrementar la contracción en músculo esquelético. Pareciera que estas dos catecolaminas actúan a través de sus receptores para, regular dos procesos importantes del organismo que están estrechamente ligados, la presión sanguínea del cuerpo y las respuestas ante el estrés o peligro, además de muchos otros más (ver **tabla 5**).

Tabla 5: Algunos procesos fisiológicos regulados por los receptores adrenérgicos.

Proceso fisiológico
Regulación central de la presión sanguínea.
Sedación y analgesia.
Modular la liberación de hormonas neurohipofisarias.
Regulación del metabolismo en hepatocitos.
Regular contracción y relajación del músculo liso y vascular.
Metabolismo de lípidos y carbohidratos.
Modulación del dolor y el estrés.
Estado cronotrópico e inotrópico cardíaco.

Se sabe que la norepinefrina, secretada por neuronas adrenérgicas, aumenta la presión sanguínea al estimular a los receptores α -adrenérgicos del músculo liso arterial. Por otro lado, la estimulación de los receptores β -adrenérgicos por la epinefrina tiene el efecto contrario y ocasiona la vasodilatación. Así, parece que la estimulación de estos receptores en el endotelio y en los músculos cardíacos, mantienen y modulan la presión sanguínea del cuerpo. La presión sanguínea también es modulada por, además de las catecolaminas, otras hormonas como la angiotensina II, la aldosterona y el cortisol.

Las respuestas ante el peligro y/o estrés son mucho más complejas ya que involucran toda clase de procesos fisiológicos actuando simultáneamente para darle al organismo una posibilidad de escapar o defenderse. Las respuestas principales son el aumento de la contracción cardíaca y la presión sanguínea, lo que permite al cuerpo una mayor irrigación de sangre a las extremidades, que el organismo deberá utilizar para escapar o defenderse. Aunado a esto, se encuentra la función de la adrenalina para aumentar la capacidad de contracción del músculo esquelético; en otras palabras, los músculos responden de manera más rápida y con más fuerza.

La base molecular de este proceso muscular comienza por la activación de los receptores β -adrenérgicos a través de la vía de transducción de la adenilato ciclasa, que conduce al incremento de la $[AMPc]_i$, mediado por G_s . Esto conlleva a la activación de PKA. La PKA fosforila y aumenta la actividad de otra cinasa, la fosforilasa cinasa, que a su vez fosforila a la glucógeno fosforilasa, también aumentado su actividad (**Fig.10**). Esta última enzima fosforila unidades de glucosa del glucógeno. Una vez fosforiladas, son aprovechables para la glucólisis y la formación subsiguiente de ATP, por la fosforilación oxidativa. La PKA también fosforila y disminuye la actividad de la glucógeno sintasa, de manera que la glucosa en el citoplasma no sea conducida a la síntesis de glucógeno, que es la molécula de reserva. Ambas acciones de la PKA permiten a las células del músculo esquelético tener una mayor disponibilidad de ATP y glucosa para mantener una contracción muscular de mayor fuerza y duración.

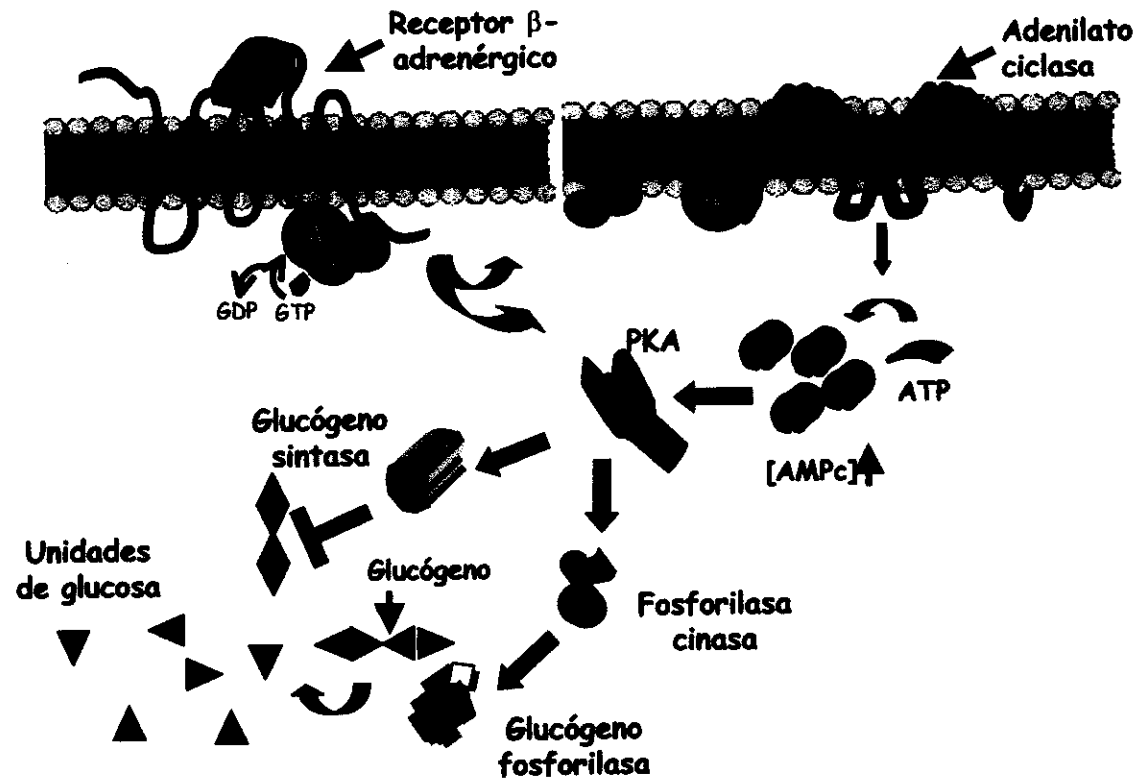


Fig. 10 La activación del receptor β -adrenérgico promueve la disponibilidad de la glucosa en músculo esquelético.

Otros procesos conducidos por la adrenalina y sus receptores son la dilatación de las pupilas y la estimulación de la secreción de saliva y de sudor. Además, la noradrenalina es un mediador importante de las respuestas ante el dolor (Kaufman, 1983). Los receptores adrenérgicos también participan en la regulación del equilibrio hídrico y de electrolitos, la contracción uterina y la modulación del metabolismo hepático (García Sáinz *et al.*, 1999b). En el hígado los receptores α_1 -adrenérgicos modulan la glucogenólisis, la gluconeogénesis, la síntesis de urea, el metabolismo de los ácidos grasos y la síntesis y secreción de proteínas, así como muchas otras funciones fisiológicas (García Sáinz *et al.*, 1999b).

Varios otros procesos son regulados a través de los receptores adrenérgicos, principalmente a través del sistema nervioso y la neurotransmisión simpática. Entre ellos está la temperatura corporal y la contracción constante de varios músculos lisos regulada por el sistema nervioso autónomo. Aunque no se conocen bien los mecanismos y procesos que regulan la temperatura corporal, sí se conocen algunos de los elementos importantes que participan en su mantenimiento. El termostato del cuerpo parece estar en el hipotálamo del cerebro. Ahí convergen y se procesan señales de varias neuronas termosensibles que se encuentran principalmente en la piel y en el sistema nervioso central, y se emiten las señales para modificar la fisiología o comportamiento del organismo para ajustar su temperatura. La inyección de norepinefrina al hipotálamo ocasiona la disminución de la temperatura corporal y la serotonina tiene el efecto opuesto (Kaufman, 1983). Se piensa que tanto estos neurotransmisores, como las prostaglandinas, son importantes en la activación de las neuronas eferentes del hipotálamo que median las respuestas fisiológicas y conductuales ante los cambios de temperatura.

Otro proceso que es regulado, parcialmente, por los agentes adrenérgicos es la contracción del esfínter inferior del esófago, el cual es importante en el proceso digestivo y que evita el reflujo de los ácidos gástricos hacia el esófago. Esto se lleva a cabo por la relajación o constricción del músculo liso que rodea esta parte del esófago. La norepinefrina, a través de la estimulación de los receptores α_1 -adrenérgicos, aumenta la contracción muscular, mientras que la epinefrina, por medio de los receptores β -adrenérgicos, la disminuye.

Por lo anterior, es evidente que los mamíferos dependen de los receptores adrenérgicos para llevar a cabo una gran variedad de procesos fisiológicos de importancia vital. De hecho, la falta de estos receptores o su mal funcionamiento en algún tipo celular se refleja en toda clase de enfermedades, como la hiper o hipotensión y la hipertrofia cardíaca, que pueden ser críticas para la sobrevivencia. Los pacientes con deficiencia cardíaca presentan generalmente altas concentraciones de catecolaminas. Hasta ahora no hay una respuesta de porqué existen tantos tipos de receptores adrenérgicos. La mayoría de los tejidos humanos expresan varios de estos receptores y éstos pueden estar mediando funciones opuestas, sinérgicas o redundantes (García Sáinz, 1995). También se ha hecho evidente que existe una comunicación cruzada entre los receptores adrenérgicos y otros receptores; por ejemplo, la activación del receptor para el ácido lisofosfatídico conlleva a la desensibilización del receptor α_{1b} a través de su fosforilación (Casas *et al.*, 2000). Definitivamente, se requieren de más estudios e investigación para explicar el papel de los receptores adrenérgicos en los procesos fisiológicos.

II.3.2 Mecanismos de Acción: Receptores Alfa1-Adrenérgicos y Vías de Transducción

El énfasis estará centrado en los mecanismos de acción de los receptores α_1 -adrenérgicos dado que el enfoque de esta tesis es el receptor α_{1b} -humano. Como se mencionó, existen tres subtipos de receptores α_1 , el α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} . Respecto a la nomenclatura farmacológica de estos subtipos se usa la letra mayúscula cuando se refiere al receptor endógeno del tipo celular en estudio. Se utiliza una letra minúscula, i.e. α_{1b} , cuando se trata de un receptor cuyo gen ha sido clonado y expresado en un tipo celular que no lo presenta de manera endógena. La principal vía de acción de estos receptores es la vía del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} activada por la fosfolipasa C- β .

- Vía de la fosfolipasa C- β y recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} .

Los tres subtipos de receptores α_1 están acoplados a la vía de activación de la fosfolipasa C- β (PLC- β) y recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} por medio de las proteínas de la familia $G_{q/11}$ (Fig. 11). Al darse la interacción entre estos receptores y su agonista, ocurre un cambio conformacional en el receptor que induce el acoplamiento y activación de la proteína G_q . La subunidad $G_{\alpha q}$, entonces, activa a la PLC- β de membrana. Las PLCs están

involucradas en la mayoría de las vías de transducción activadas por receptores de membrana y existen 10 isoformas tan sólo en mamíferos que han sido clasificadas en PLC- β 1-4, PLC- γ 1-2 y PLC- δ 1-4 (Williams, 1999). Las de tipo β son las que están acopladas a las respuestas adrenérgicas. Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de un fosfolípido de la membrana, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂).

El resultado de esta hidrólisis es la producción de dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). El DAG actúa como activador de la PKC, y el IP₃ actúa sobre receptores canal del retículo endoplásmico que conllevan a la liberación de Ca²⁺ al citosol (Fig. 11). En esta vía, el Ca²⁺ intracelular funge como un segundo mensajero, que modula la actividad de varias enzimas, principalmente como cofactor enzimático o a través de la formación de un complejo Ca²⁺/calmodulina y la activación subsiguiente de cinasas dependientes de este complejo (Alberts, 1994). El aumento de [Ca²⁺]_i se comporta como una onda que sube abruptamente de una concentración basal de aproximadamente 100nM hasta niveles de 6 μ M (dependiendo principalmente del tipo celular) y luego disminuye rápidamente (Fig. 12). Este comportamiento ocurre porque los canales de Ca²⁺ intracelular son estimulados positivamente por el Ca²⁺ inicial liberado, presentando un mecanismo de retroalimentación positiva muy rápido. Hay al menos dos eventos que ocurren para restaurar el nivel basal de la [Ca²⁺]_i. El IP₃ pasa por un ciclo (Fig. 13) donde es desfosforilado por una serie de fosfatasas específicas, inactivando su efecto sobre los canales del retículo endoplásmico, y el Ca²⁺ ya liberado es bombeado, principalmente, fuera de la célula. Aunque rápido, este incremento temporal de Ca²⁺ intracelular es suficiente para producir una amplia gama de respuestas celulares, participando en la transducción y amplificación del estímulo original.

El segundo producto de la hidrólisis de PIP₂ es el DAG, este tiene dos papeles potenciales de señalización. Por un lado, puede hidrolizarse una segunda vez para formar ácido araquidónico, que sirve principalmente como sustrato en la síntesis de eicosanoides.

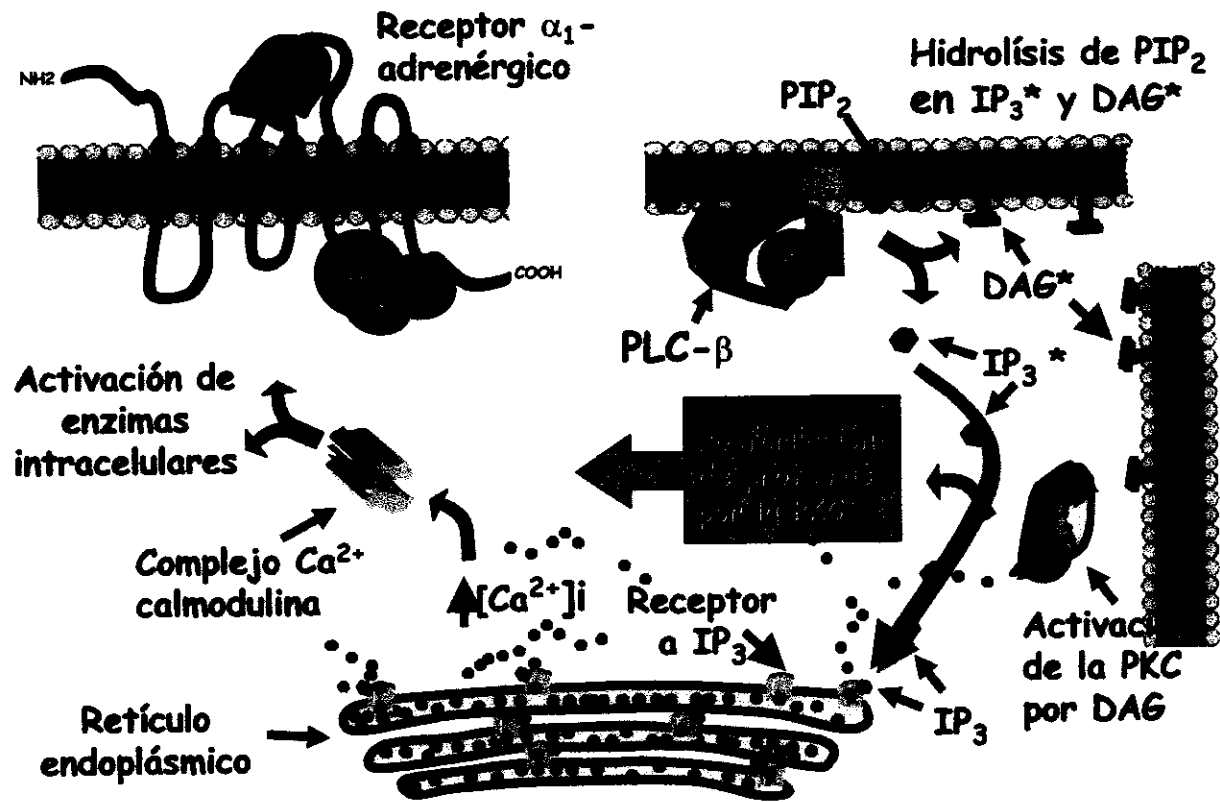


Fig. 11 Vía de la fosfolipasa C- β y recambio de fosfoinosítidos/Ca²⁺.

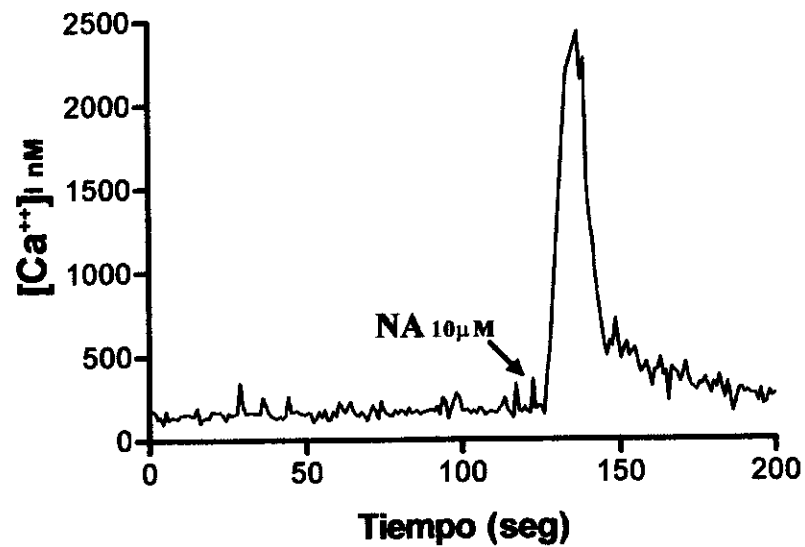


Fig. 12 Al estimular células que expresan receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos con noradrenalina (NA), ocurre un incremento rápido y transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$.

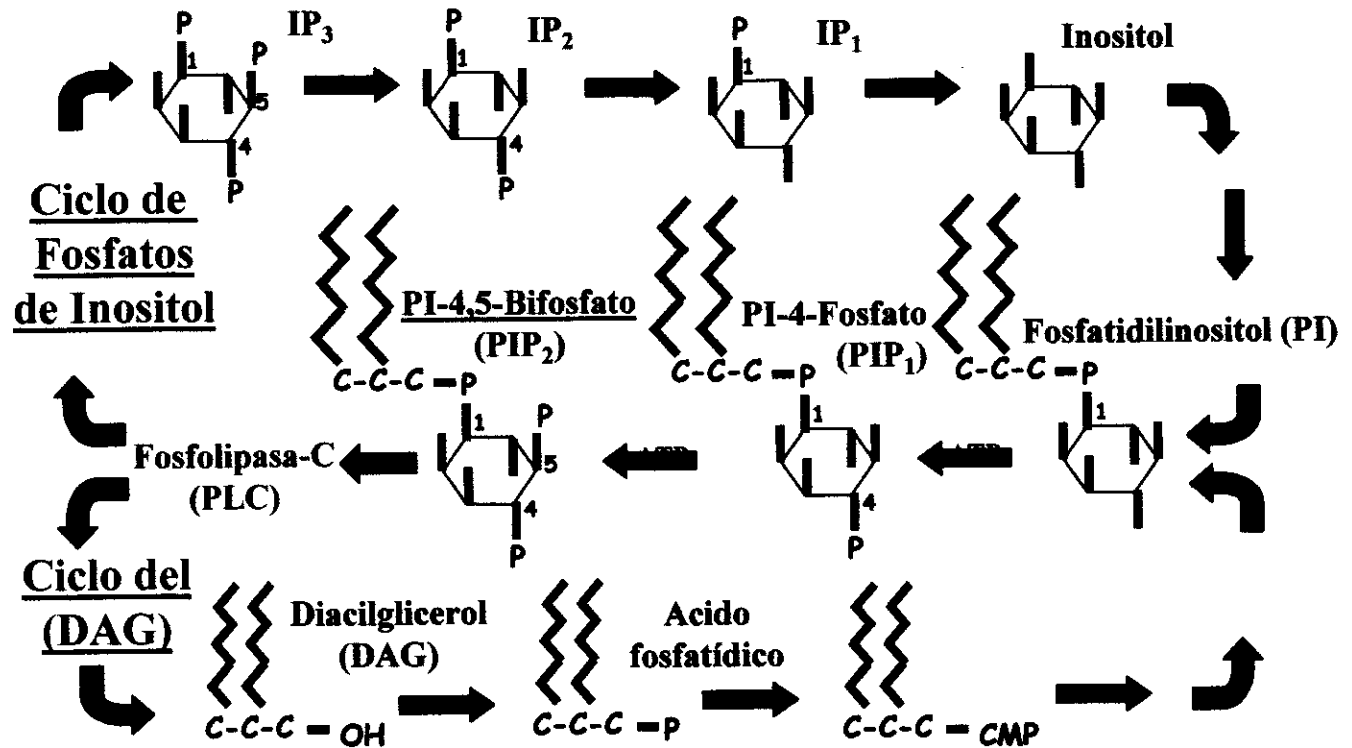


Fig. 13 Posterior a la hidrólisis del PIP₂, el DAG y los fosfatos de inositol, IP₃, IP₂, IP₁, son reciclados y sirven de segundos mensajeros.

Por otro lado, el DAG sirve para activar a la PKC, una cinasa de serina/treonina (Fig.11). Se piensa que el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ ocasiona que la PKC sea trasladada del citoplasma hacia la membrana, donde es activada por el DAG (Alberts, 1994). Existen al menos 8 isoformas distintas de PKC en mamíferos y se ha demostrado que 4 de ellas son activadas por DAG. Una vez activada, la PKC fosforila residuos de serina y treonina de varias otras cinasas y proteínas modulando su actividad.

Los ésteres de forbol, entre ellos el forbol-miristato acetato (PMA), se unen a la PKC para activarla sustituyendo al diacilglicerol. Se ha visto que la activación de PKC por PMA produce varios de los efectos de la activación de GPCRs acoplados a Gq, sin embargo, el PMA también posee efectos contrarios de inhibición. Ante la activación de PKC por PMA, los efectos de la noradrenalina sobre los receptores α_1 -adrenérgicos son completamente bloqueados en células hepáticas de rata (Corvera *et al.*, 1986). Este bloqueo está dado porque la PKC fosforila a estos receptores en su extremo carboxilo (Diviani *et al.*, 1997) ocasionando un bloqueo estérico para la unión de la proteína G y una pérdida de afinidad del receptor por su agonista. Así, independientemente de la concentración de la hormona, la respuesta celular se ve bloqueada (Fig.14). De esta manera, la PKC, además de actuar como un efector celular de la cascada de señalización, funge como un regulador negativo de los receptores α_1 -adrenérgicos.

La vía del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} puede activarse por otras proteínas G. Las proteínas $G_{i/o}$, a través de sus subunidades $\beta\gamma$, lo logran al asociarse a la PLC- β (Exton, 1994). Esta vía también puede ser estimulada por los receptores con actividad de cinasa de tirosina, que después de unirse a su agonista y transfosforilarse, se asocian a las isoformas γ de la fosfolipasa C (PLC- γ) mediante sus dominios citoplásmicos (dominios SH2) (Exton, 1994). Esto es un claro ejemplo de como distintos receptores pueden hacer uso de las mismas vías de transducción. Lo asombroso es que el estímulo y los receptores involucrados determinan los efectos finales de la respuesta celular, aun si se está haciendo uso de una vía de transducción similar.

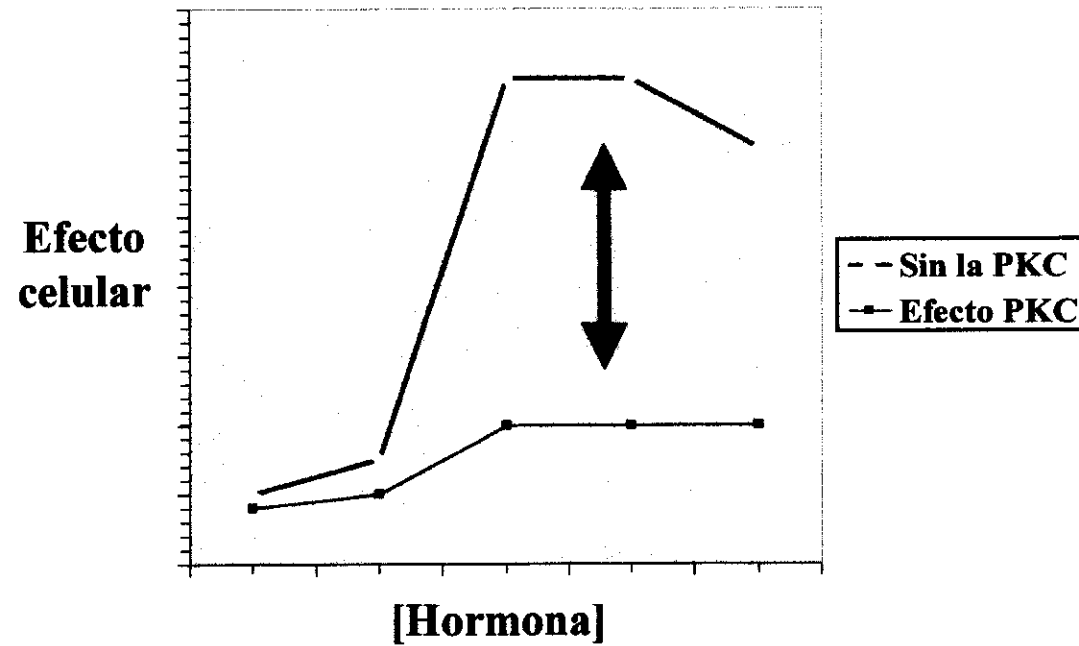


Fig. 14 La activación de la PKC bloquea la respuesta de los receptores α_1 -adrenérgicos sin depender de la concentración de hormona que se adicione.

Los receptores α_1 -adrenérgicos son capaces de activar a otras vías de transducción, como la vía del AMPc y la PKA, activación que resulta de la acción directa de una proteína G_s y posiblemente de mecanismos secundarios al recambio de fosfoinosítidos y de la PKC (Cotecchia *et al.*, 1990). También se ha postulado que la PKC y los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ participan en la activación de la fosfolipasa D, aunque los mecanismos están pobremente descritos (Llahi and Fain, 1992). Muchas de las respuestas que se observan a través de dichas vías de transducción incluyen re-arreglos del citoesqueleto y cambios en la secreción celular.

Por mucho tiempo se pensó que la división y diferenciación celular se regulaban únicamente por los receptores con actividad de tirosina cinasa, a través de la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Se pensaba también que los GPCRs estaban encargados principalmente de controlar la actividad metabólica y los niveles de segundos mensajeros en la célula y que no tenían mucho que ver en la división celular. En años recientes, se descubrió que los GPCRs son capaces de activar las vías de las MAPK, por lo que muchos estudios se realizan para elucidar los patrones de transcripción de genes que inducen las MAPK y los mecanismos moleculares involucrados en la participación de los receptores α_1 -adrenérgicos.

Es claro que las vías de transducción que los receptores α_1 -adrenérgicos activan tienen importantes efectos dirigidos al núcleo celular. La activación de estos receptores conduce a un aumento de la división celular, mientras que algunas de sus formas mutantes, constitutivamente activas, promueven la formación de tumores celulares. De hecho, los genes de los receptores α_1 -adrenérgicos han sido considerados como proto-oncogenes (Allen *et al.*, 1991). Una de las respuestas iniciales de la división y proliferación celular es la expresión de genes tempranos, de la primera fase, como *c-jun* y *c-fos*. Los receptores α_1 -adrenérgicos son capaces de inducir la expresión de estos genes en muchos tipos celulares como los miocitos cardiacos, células de la aorta de rata, células de músculo liso, hepatocitos y varias líneas celulares transfectadas (revisado por García Sáinz *et al.*, 1999b).

Estos procesos parecen depender de la participación de la PKC y del Ca^{2+} intracelular, aunado a eventos como la activación de la cinasa 3 del fosfatidilinositol (PI3K) por acción de G_i ; a la fosforilación de residuos de tirosina de varias proteínas y a la activación de cinasas dependientes de segundos mensajeros como la PKA. En el caso de los receptores α_1 -adrenérgicos, éstos inducen la hipertrofia de miocitos cardiacos a través de la fosforilación del factor de transcripción RTEF-1 por acción de la PKC y de una MAPK (Ueyama, 2000). También se ha visto que los receptores α_1 -adrenérgicos transfectados en células nerviosas de rata (PC12) son capaces de activar las tres distintas vías de las cinasas activadas por mitógenos promoviendo la diferenciación de las células a un fenotipo neural, muy similar al que es inducido por el factor de crecimiento nervioso (Minneman *et al.*, 2000), un factor de crecimiento acoplado a receptores con actividad de tirosina cinasa.

Aunque no se han definido todos los mecanismos por los cuales los receptores α_1 -adrenérgicos conducen a la síntesis de DNA, a la diferenciación y a la proliferación celular, varias teorías están surgiendo. Estudios recientes han propuesto modelos donde la activación de una vía por GPCRs conduce a la transactivación de otros receptores acoplados a la vía de las MAPK, como lo son los receptores a factores de crecimiento. Se ha demostrado que la activación de G_q , por el receptor a angiotensina II, conduce a la activación de la vía de las MAPK, a través de una transactivación del receptor con actividad de tirosina cinasa para EGF (factor de crecimiento epidérmico) que depende de la movilización del Ca^{2+} intracelular (Eguchi *et al.*, 1999). Las respuestas de incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por los receptores α_{1b} podrían estar induciendo procesos similares.

La activación de la vía de G_i , por los receptores α_{1A} , disminuye la actividad de la adenilato ciclasa por medio de la unión de la subunidad $G_{\alpha i}$ a esta enzima. Ahora se sabe que la $G_{\beta\gamma i}$ liberada conduce a la activación de varias cinasas de la vía de las MAPK como p21^{ras}, RAF, MEK y la PI3K (Bourne, 1995). Es interesante mencionar que estudios actuales postulan la posibilidad de que la PI3K esté involucrada en la activación de la PKC (Casas *et al.*, 2000), la cual se ha visto que ejerce una modulación heteróloga sobre el receptor α_{1b} -adrenérgico, por su fosforilación. Así podemos apreciar que todos los receptores α_1 -adrenérgicos están participando en vías de regulación metabólica y de segundos mensajeros, así como de proliferación y división celular, pero por mecanismos

diferentes. Además, se hace evidente que dentro de la célula todas las vías que son activadas por estos receptores pueden converger para dar las respuestas observadas.

II.3.3 Procesos regulativos: Fosforilación y Desensibilización

Como se explicó anteriormente, la principal forma de regular la comunicación celular radica en la modulación de los receptores y sus efectores, tanto en su expresión como en su función y su afinidad. La modulación de la función y afinidad de los GPCRs ocurre a través de procesos llamados desensibilización y resensibilización, los cuales son eventos importantes en la adaptación de las células ante los millares de estímulos que reciben. La desensibilización comprende una serie de procesos por los cuales los GPCRs presentan una atenuación en su respuesta, ya sea porque pierden la afinidad por su agonista o su capacidad de activar a una proteína G. Como se ha mencionado, después de ser estimulados, los GPCRs son internalizados dentro de la célula por un proceso de endocitosis. La atenuación de la respuesta de los GPCRs inducida por agonistas ocurre apenas minutos después de su activación (Hausdorff *et al.*, 1990). Uno de los eventos principales que es responsable de esta regulación es la fosforilación de los receptores. En el caso de los receptores α_1 -adrenérgicos, esta fosforilación se debe a tres tipos de cinasas: cinasas activadas por segundos mensajeros como la PKA y PKC; miembros de la familia de cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs); y algunos receptores con actividad de tirosina cinasa (revisado por García Sáinz *et al.*, 1999b; 2000).

Se pueden distinguir dos tipos de mecanismos de desensibilización, homóloga y heteróloga (Hausdorff *et al.*, 1990). La desensibilización homóloga se define como una pérdida rápida de respuesta para un receptor que ha sido expuesto repetidamente a su agonista específico, mientras que en la desensibilización heteróloga la estimulación de un receptor por su agonista puede atenuar la respuesta de otros receptores que estén mediando respuestas similares (Fig. 15) (Diviani *et al.*, 1997). Dentro de los estudios de desensibilización de la familia de los GPCRs, el receptor a rodopsina del sistema visual y el β_2 -adrenérgico han sido los más estudiados. Estos estudios llevaron a la caracterización inicial de las GRKs.

Hasta ahora, la familia de GRKs consiste de 6 miembros llamados GRK1 a 6 (Iacovelli *et al.*, 1999). La GRK2 ha sido la más estudiada y se ha comprobado que para desplazarse del citoplasma a la membrana y activarse es necesaria su interacción con las subunidades $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas G a través de su dominio carboxilo terminal (Sallese *et al.*, 2000). Además, estudios recientes han postulado la posibilidad de que la GRK2, mediante su dominio amino terminal, se asocie a la $G_{\alpha q}$ inactivándola por medio de un mecanismo que promueve la hidrólisis del GTP de la $G_{\alpha q}$ (Sallese *et al.*, 2000). Así, estas cinasas tienen la capacidad de reconocer, fosforilar e inactivar a los GPCRs, particularmente después de su activación (en su conformación ocupada por el agonista) (Diviani *et al.*, 1997). Los receptores α_1 -adrenérgicos pueden ser fosforilados y desensibilizados por cinasas activadas por segundos mensajeros, además de las GRK's.

La fosforilación de un GPCR ocasiona un impedimento estérico a la interacción con las proteínas G. Esta fosforilación también induce la asociación del receptor con proteínas llamadas β -arrestinas (**Fig.16**) (Benovic *et al.*, 1986). Estas se unen al receptor fosforilado y toman dos funciones. Primeramente, lo desacoplan de la vía de transducción al impedir que el receptor interactúe con proteínas G. En segundo lugar, las arrestinas acoplan al receptor a proteínas de membrana llamadas clatrininas. La interacción del complejo receptor- β -arrestinas con las clatrininas inducen el proceso de endocitosis. Tanto las GRKs como las β -arrestinas son necesarias para iniciar y mediar el proceso de secuestro de los receptores (Ferguson *et al.*, 1996; 1997). De esta manera, el receptor fosforilado es internalizado en una vesícula (**Fig.16**). Posteriormente, los receptores pueden reciclarse o degradarse intracelularmente. En su reciclamiento y resensibilización, parece ser indispensable su internalización, ya que existen fosfatasa específicas que interactúan con los receptores para desfosforilarlos intracelularmente (Zhang *et al.*, 1997). Se sugiere que así actúa el proceso de resensibilización, a través del secuestro de los receptores al interior de la célula para su desfosforilación y para devolverlos a su conformación basal (pre-agonista).

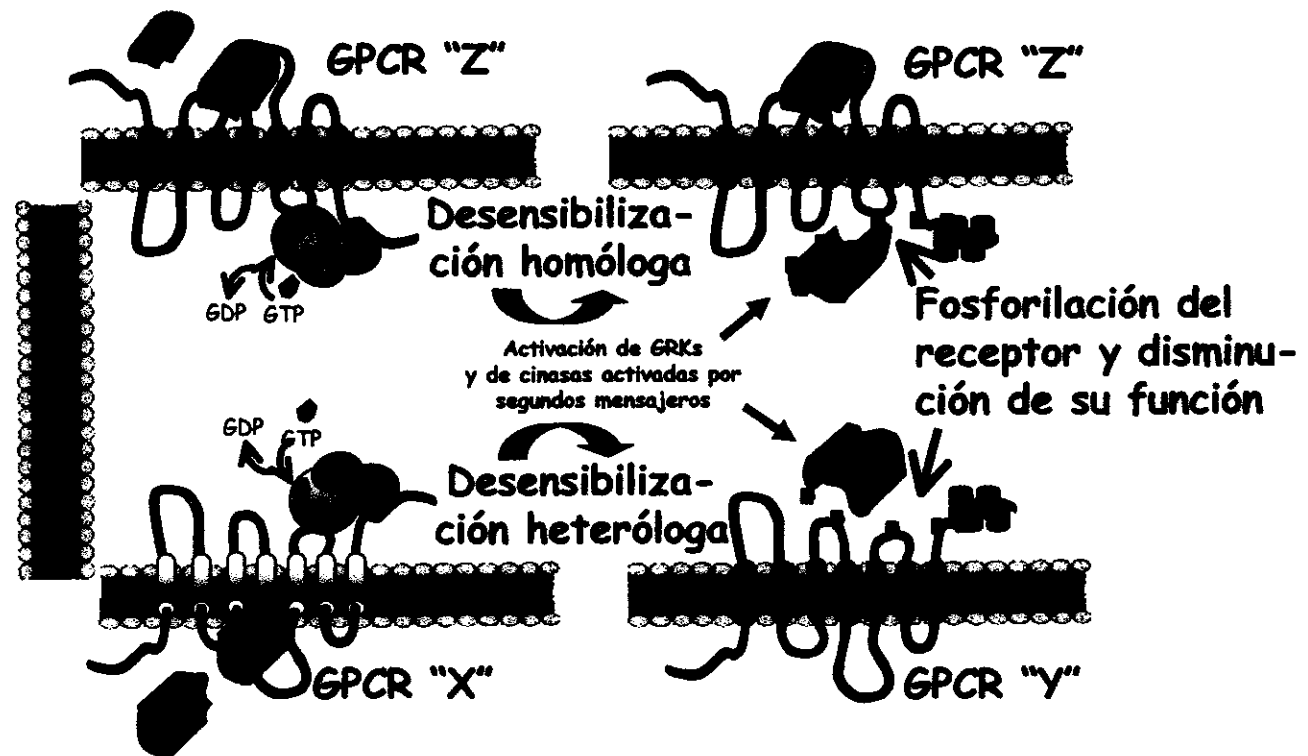


Fig. 15 La desensibilización de un GPCR puede ser homóloga (subsecuente a su activación) o heteróloga (por la activación de un GPCR diferente).

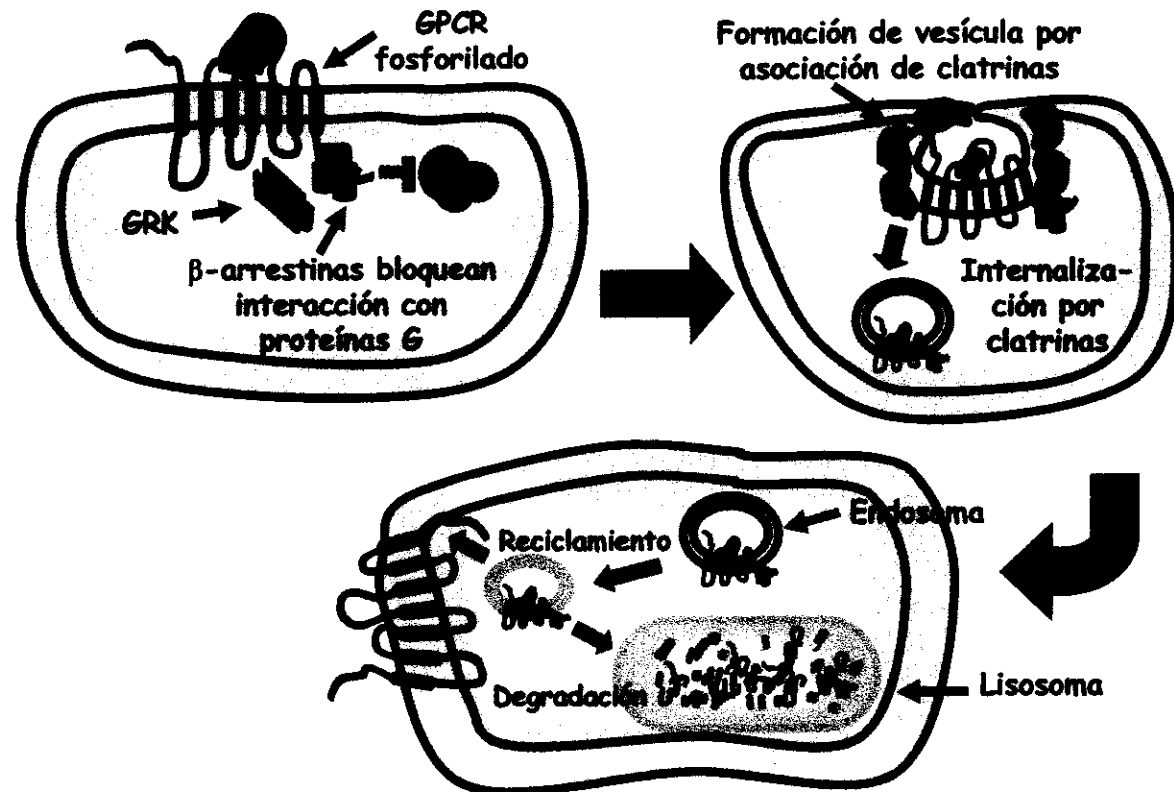


Fig. 16 Posterior a su activación, un GPCR es fosforilado e internalizado. Después es reciclado o degradado.

Es interesante mencionar que tal vez el proceso de internalización de los receptores adrenérgicos no solo esté actuando para terminar la cascada de señalización, sino para activar a los receptores o en su defecto activar a otras vías de señalización intracelular. Algunos investigadores han demostrado que la internalización del receptor β_2 -adrenérgico es necesaria para inducir la activación de la vía de las MAPK (McCune *et al.*, 2000).

El receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster también es internalizado por un proceso que comienza con la fosforilación del receptor. Posterior a su estimulación por agonistas, el receptor α_{1b} -adrenérgico puede fosforilarse por al menos dos cinasas *in vivo*: la PKC, después de su activación por PMA o por el DAG, y la GRK2 y 3 (Diviani *et al.*, 1996). Esta fosforilación no es bloqueada por inhibidores de la PKC por lo que se ha sugerido que esta cinasa actúa más como mediador de la desensibilización heteróloga y que la GRK2 se encuentra mediando la desensibilización homóloga de este receptor (Lattion *et al.*, 1994). Sin embargo, recientemente se ha visto que la actividad de PKC, inducida por agonistas del receptor, es requerida para el proceso de internalización (Awaji *et al.*, 1998). Los sitios para estas fosforilaciones se encuentran en residuos de serina del segmento carboxilo terminal y es importante mencionar que cada tipo de cinasa fosforila residuos diferentes. La GRK2 fosforila los residuos de Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ para modular la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster y la PKC actúa sobre la Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰ (Fig. 17) (Diviani *et al.*, 1997).

A través de procesos como; la fosforilación ocasionada por cinasas activadas por segundos mensajeros, como PKC y las GRKs, el desacoplamiento de proteínas G, la asociación con β -arrestinas y la internalización, estos receptores son modulados en su función. Tomando todos estos procesos en conjunto uno puede empezar a vislumbrar la complejidad de los sistemas de transducción mediados por los receptores adrenérgicos y la capacidad de las células de modular a un nivel muy preciso sus respuestas celulares.

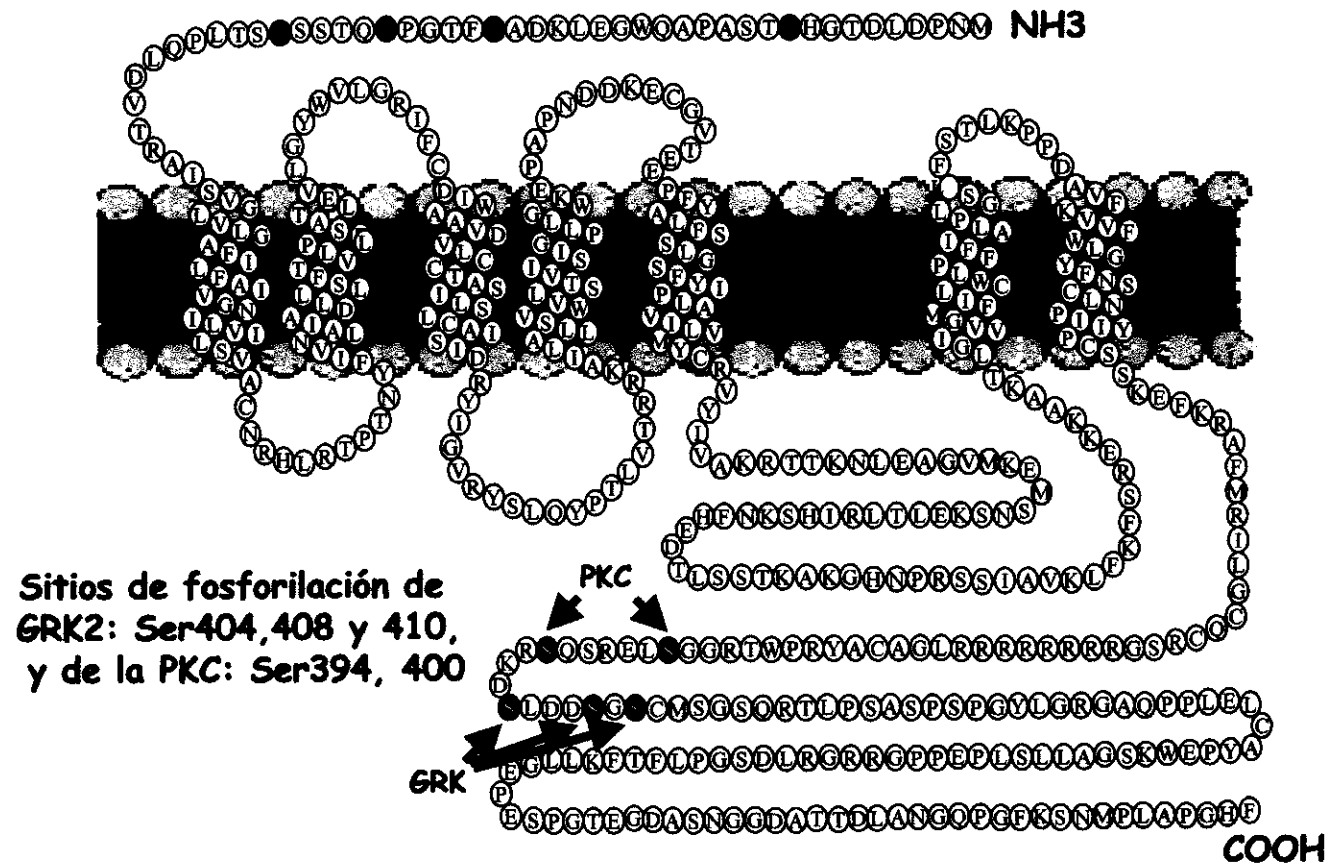


Fig. 17 Esquema del receptor α_{1B} adrenérgico de hámster.

II.4 La Transfección como una Herramienta de Estudio

La transfección es una metodología de la biología molecular utilizada para expresar proteínas o péptidos de interés en células que no los expresan de manera endógena. Esto se logra, primeramente, aislando y clonando al gen que codifica a la proteína de interés. Después, se inserta ese gen en un vector que permita su manipulación, tal como un plásmido. Luego, el plásmido que porta al gen es amplificado, y finalmente, introducido a las células del estudio por varias metodologías posibles. Existen dos clases de transfección, transitoria y permanente o estable. En la primera, la célula tratada es capaz de expresar la proteína de interés, pero por un periodo de tiempo limitado, pues el plásmido que porta al gen no es incorporado al DNA celular y es degradado. En una transfección estable el plásmido, y el gen que porta, es incorporado al DNA nuclear de la célula donde permanece de manera permanente.

Para asegurar que el gen de interés sea expresado en las células transfectadas existen varias estrategias metodológicas. Es común que el vector que porta al gen clonado, también porte genes que codifican para proteínas que confieren a las células con una resistencia contra algún antibiótico o fármaco. Así que, las células son cultivadas en un medio de selección donde solo sobrevivan las que estén expresando los genes transfectados. Otro caso común, es que el vector posea secuencias promotoras de la transcripción próximas a la región donde se encuentra el gen de interés, y que la transcripción de estas regiones sea inducida fácilmente por la presencia de alguna sustancia activadora de la transcripción.

La transfección es una herramienta sumamente importante para el estudio de las proteínas y tiene una variada gama de aplicaciones. Dentro del marco de los receptores celulares, la transfección ha impulsado enormemente su estudio y caracterización. Por ejemplo, la caracterización de los diferentes subtipos de receptores adrenérgicos, y la de muchos otros más, no hubiese sido posible sin haberlos transfectado, dado que las células que los expresan de manera endógena expresan más de un subtipo a la vez. Al querer estimular al receptor bajo estudio se estarían estimulando a los demás. La transfección permite expresar cada subtipo de receptor de manera aislada, asegurando, de esta manera, que los efectos observados se deban al receptor de interés.

En el caso de este trabajo, y de la mayoría de los estudios que pretenden estudiar y caracterizar la función de proteínas humanas, la transfección es indispensable, pues, por cuestiones éticas importantes a la sociedad, está prohibido el estudio de células y tejidos humanos *in vivo* (salvo algunas excepciones). Por eso, la mayoría de los estudios de ésta índole se realizan en células animales que tengan un alto grado de similitud con células humanas, y que, además sean fáciles de obtener y de manipular. Existen varias líneas celulares comerciales de este tipo, que han sido inmortalizadas para su cultivo en el laboratorio. Los fibroblastos de varios mamíferos son comunes entre éstas líneas comerciales, dado a que presentan características que las hacen buenos modelos de estudio: se dividen rápidamente, son resistentes a los procesos de congelación y mantenimiento del laboratorio, pueden ser transfectados con cierto grado de facilidad, son muy abundantes y pueden ser obtenidos con facilidad de tejidos primarios. Las células utilizadas en el estudio de esta tesis se obtuvieron comercialmente, posterior a su transfección estable, con el receptor adrenérgico $\alpha_{1\beta}$ -humano.

III. Antecedentes del Trabajo Experimental

Es evidente que los receptores adrenérgicos pueden variar en su función dependiendo del tejido y de la especie en cuestión. En los α_1 -adrenérgicos, se ha comprobado que varía la expresión de cada subtipo en cada tejido y tipo celular y que esta variación es especie-específica. En el hígado de ratas, ratones, peces y pollos el subtipo principal de receptor adrenérgico que se expresa es el α_{1B} , mientras que en el hígado de conejos, perros y humanos se expresa preferencialmente el subtipo α_{1A} (García Sáinz, 1995). Además, se observan diferencias significativas de afinidad por agonistas y antagonistas de un mismo subtipo de receptor en especies diferentes (García Sáinz 1995 y García Sáinz *et al.*, 1999b). El estado de fosforilación es un factor determinante de ésta afinidad, así como del funcionamiento de los α_1 -adrenérgicos.

En estudios previos usando hepatocitos de rata, se demostró que la activación de la proteína cinasa C (PKC) bloqueaba las respuestas celulares mediadas por los receptores α_{1B} -adrenérgicos (Corvera y García Sáinz, 1984; Corvera *et al.*, 1986). Se demostró que esta inhibición se debía al estado de fosforilación del receptor. En los últimos 5 a 6 años se ha progresado en el entendimiento de la fosforilación de este receptor. Lo cual comprende la identificación puntual de los sitios de fosforilación en el extremo carboxilo (Lattion *et al.*, 1994; Diviani *et al.*, 1997), el efecto de diversas GRK's (Diviani *et al.*, 1996) y la regulación cruzada o fosforilación inducida por la activación de otros receptores como el de endotelina (Vázquez-Prado *et al.*, 1997), bradicinina (Medina *et al.*, 1998) y ácido lisofosfatídico (Casas *et al.*, 2000). Todos estos estudios se realizaron utilizando el receptor α_{1B} -adrenérgico de hámster, expresado endógenamente en células DDT₁ MF-2 o transfectado en otros tipos celulares modelo como las células Rat-1. Es claro que los receptores α_1 -adrenérgicos de un mismo subtipo pueden estar funcionando de maneras distintas en cada especie e incluso tejido. Por lo tanto, no es correcto generalizar los resultados de la caracterización funcional de un receptor y esperar que sean iguales para otras especies.

Recientemente, los receptores α_1 -adrenérgicos humanos se han clonado, expresado y caracterizado farmacológicamente, pero ningún estudio sobre su función y desensibilización

ha sido reportado. Por lo tanto, solo puede especularse que el receptor α_{1B} -adrenérgico humano funciona de manera similar a los que han sido estudiados, principalmente el de hámster. En este estudio se tomó la ventaja de tener acceso al receptor adrenérgico α_{1B} -humano transfectado en fibroblastos murinos para llevar a cabo su caracterización funcional.

IV. Hipótesis

Si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano, transfectado en la línea celular de fibroblastos murinos CRL-11139, se encuentra acoplado a la vía de transducción de la activación de la fosfolipasa C- β y el recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , entonces su activación por el agonista noradrenalina deberá conducir a aumentos en la concentración intracelular de Ca^{2+} y fosfoinosítidos. Además deberá presentar una desensibilización dependiente de la activación de PKC, como ocurre con el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster.

V. Objetivos

- Estudiar los efectos producidos por la noradrenalina en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los fibroblastos murinos transfectados con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano.
- Estudiar los efectos producidos por la noradrenalina en la producción de fosfatos de inositol en los fibroblastos murinos transfectados con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano.
- Estudiar los efectos de la PKC en el recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} mediado por el receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos.
- Determinar si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano funciona de manera similar, en términos generales, al receptor α_{1b} -adrenérgicos de hámster.

IV. Hipótesis

Si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano, transfectado en la línea celular de fibroblastos murinos CRL-11139, se encuentra acoplado a la vía de transducción de la activación de la fosfolipasa C- β y el recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} , entonces su activación por el agonista noradrenalina deberá conducir a aumentos en la concentración intracelular de Ca^{2+} y fosfoinosítidos. Además deberá presentar una desensibilización dependiente de la activación de PKC, como ocurre con el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster.

V. Objetivos

- Estudiar los efectos producidos por la noradrenalina en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los fibroblastos murinos transfectados con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano.
- Estudiar los efectos producidos por la noradrenalina en la producción de fosfatos de inositol en los fibroblastos murinos transfectados con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano.
- Estudiar los efectos de la PKC en el recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} mediado por el receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos.
- Determinar si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano funciona de manera similar, en términos generales, al receptor α_{1b} -adrenérgicos de hámster.

VI. Diseño Experimental

Una manera de determinar si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano se encontraba acoplado a la vía de transducción del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} fue examinar si su activación por noradrenalina inducía una variación en la concentración intracelular de estos segundos mensajeros. Primeramente, se estableció el cultivo celular de los fibroblastos transfectados con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano de manera que se tuviesen células suficientes para todos los experimentos. Después se procedió a medir y cuantificar la concentración intracelular del ion calcio y de los fosfatos de inositol (**Fig. 18**).

El Ca^{2+} es un ion muy abundante, se encuentra tanto fuera de las células, en el medio de cultivo y la solución amortiguadora, como dentro de ellas, en el citoplasma y compartimentos celulares y a diferentes concentraciones. Para medir el Ca^{2+} del citoplasma se recurrió a la utilización de un compuesto capaz de unirse con alta afinidad al ion, y que, reflejara exclusivamente su concentración citosólica. El Indo-1AM es una molécula capaz de penetrar la membrana plasmática para entrar a la célula gracias a que se encuentra en una forma esterificada, que lo hace liposoluble. Sin embargo, una vez en citoplasma, enzimas esterasas hidrolizan sus grupos ester dejando al compuesto hidrofílico atrapado sin posibilidad de difundir fuera de la célula o hacia otros compartimentos intracelulares. Este fluoróforo es un compuesto que fluoresce al interactuar con el Ca^{2+} y su fluorescencia puede ser medida con facilidad. Después de realizar las mediciones de fluorescencia, por una ecuación matemática se convirtieron los datos a cuantificaciones de la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Para cuantificar a los fosfatos de inositol se realizó una metodología donde, después de estimular al receptor adrenérgico, se neutralizaron y lisaron las células para aislar a los fosfoinosítidos (**Fig. 18**). La fracción pesada de las muestras celulares fue separada por centrifugación y la fracción soluble fue sometida a una cromatografía de intercambio aniónico que permitió eluir y separar a cada una de las tres moléculas (IP_1 , IP_2 , IP_3) por su carga electroquímica. Para asegurar que sólo se midieran los fosfoinosítidos producidos a partir de la estimulación con noradrenalina (dado que pueden estarse produciendo

fosfoinosítidos por otros procesos celulares), previo a la estimulación, a las células del estudio se les sustituyó el inositol por inositol marcado radiactivamente. Al utilizar un contador de centelleo para cuantificar a los fosfatos de inositol, solo se registraron los que se produjeron con el inositol radiactivo.

La cuantificación de las concentraciones intracelulares de estos segundos mensajeros se realizó a niveles basales de estimulación y bajo diferentes tratamientos de agonistas del receptor α_{1b} -adrenérgico humano. Para estudiar la regulación del receptor por la PKC, se realizaron mediciones similares en la presencia y ausencia de un activador e inhibidor selectivo de esta proteína cinasa. Además se indujo la pérdida de actividad de la cinasa y se probaron las condiciones mencionadas anteriormente. Para cada condición se realizó un experimento independiente al menos por triplicado y los resultados fueron comparados y analizados.

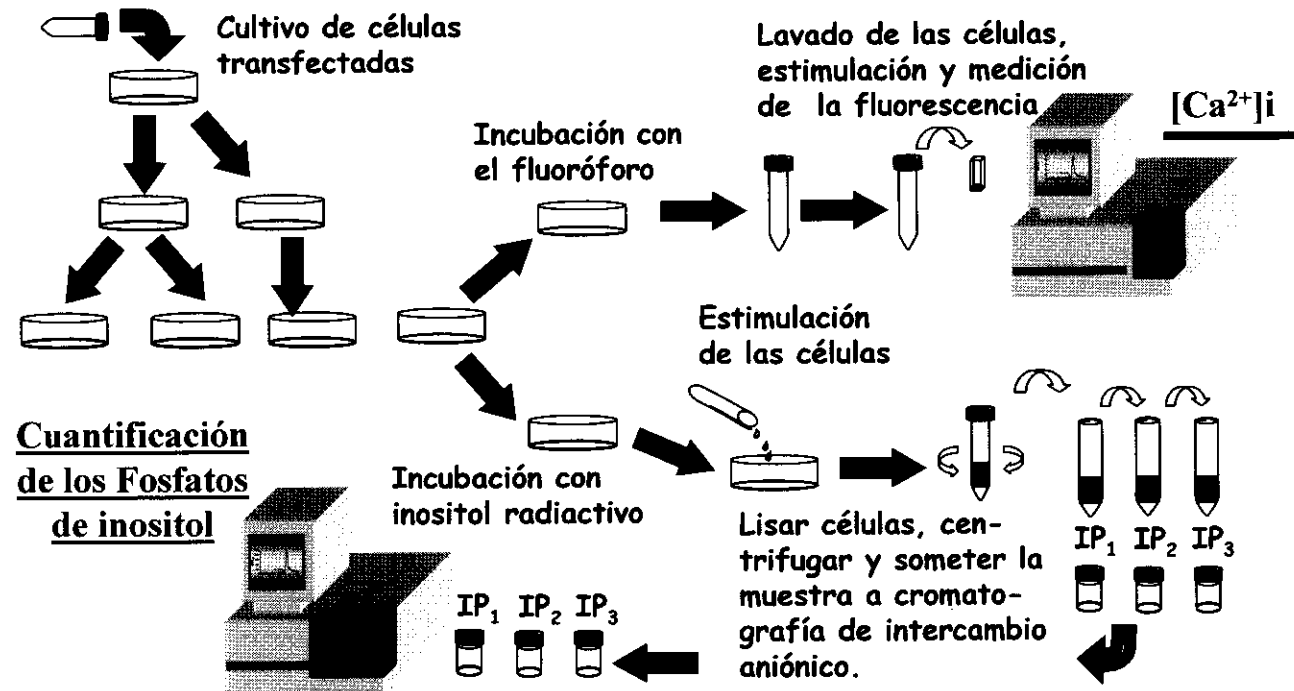


Fig. 18 Diseño experimental para estudiar la función y regulación del receptor α_{1b} -adrenérgico de humano.

VII. Materiales y Métodos

- Hormonas y Reactivos

La (-)-noradrenalina, el PMA y el ácido lisofosfatídico (LPA) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Ro-31-8220 (3-[1-[3-(amidinothio) propyl-1H-indol-3-y1]-3-(1 methyl-1H-indol-3-y1) maleimide methane sulfonate) provino de Calbiochem. El DMEM, suero de feto bovino, tripsina, antibióticos y otros reactivos usados para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco BRL. [2,3-³H]myo-inositol (22.9 Ci/mmol) se obtuvo de New England Nuclear. El Indo-1/AM provino de Molecular Probes.

- Cultivo Celular.

Para este estudio se utilizaron células, fibroblastos murinos, obtenidas de la línea comercial CRL-11139 (de la ATCC: American Type Culture Collection) transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano. Después de descongeladas, las células se cultivaron en cajas de petri de 10cm de diámetro, en medio DMEM con glutamina y alto contenido de glucosa, complementado con 10% de suero de feto bovino, 300 μ g/ml del análogo de neomicina, G-418 sulfato (un reactivo de selección para células transfectadas), 100 μ g/ml de estreptomina, 100 U/ml de penicilina y 0.25 μ g/ml de anfotericina B. El cultivo de las células se llevó a cabo en una atmósfera de 95% aire y 5% de CO₂ a 37⁰C. Al llegar a confluencia (formación de una monocapa sobre el fondo de la superficie de la caja de petri) las células se utilizaron para los experimentos o se resembraron. Las células utilizadas no llegaron a más de 12 pases.

- Medición de [Ca²⁺]_i.

Al llegar a confluencia, los fibroblastos se incubaron toda la noche (~ 12hrs.) con medio DMEM sin suero y antibióticos. Esto que para eliminar a las moléculas presentes en el suero que pudieran estimular a las células. Al día siguiente, las células se cargaron con el fluoróforo Indo-1/AM 5 μ M en una solución de 3ml de medio Krebs-Ringer-Hepes complementada con albúmina de suero bovino 0.05%, a pH 7.4 durante 1 hr. a 37⁰C y en atmósfera de 5% de CO₂.

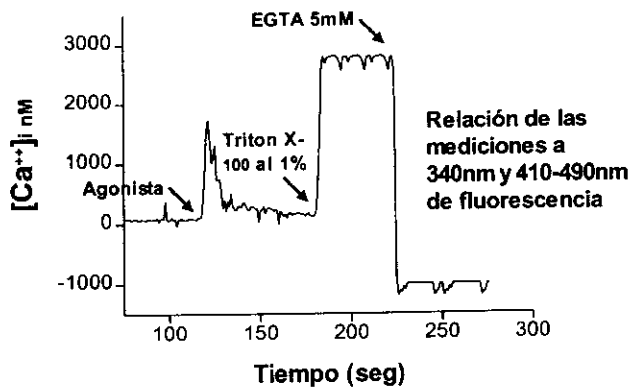
Después de la incubación de una hora se lavaron las células tres veces con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar la albúmina y el Indo-1/AM externo. Posteriormente, las células se resuspendieron, con tripsinización moderada, en 10ml de medio Krebs-HEPES-Glucosa complementado con CaCl_2 1.3 mM. Las células se trasladaron a un tubo cónico de 15ml y se lavaron tres veces. Cada lavado consistió de una centrifugación de 5 minutos a 3000rpm. El sobrenadante se descartó y el botón celular se resuspendió suavemente con 10ml de medio Krebs-HEPES-Glucosa complementado con CaCl_2 . Las mediciones se realizaron con las células en suspensión, a 37°C .

La movilización del Ca^{2+} intracelular ante la estimulación con diferentes concentraciones de ligandos y PMA se cálculo a través de la medición de la fluorescencia en las células, en agitación constante a 37°C , utilizando un espectrofotómetro / fluorómetro (AMINCO-Bowman Serie 2) capaz de registrar la fluorescencia a las longitudes de onda (λ) del fluoróforo utilizado: 340 nm de excitación con un intervalo de 0.5 segundos y 410 y 490 nm de emisión. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se cuantificó utilizando un programa de computadora incluido en el espectrofotómetro a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima, de acuerdo a la ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] [Sf_2/Sb_2]$$

donde la K_d representa la constante de afinidad del Indo-1/AM por el Ca^{2+} (250nM); R es la lectura de la fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{\min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar el quelante de Ca^{2+} EGTA (5 mM) y R_{\max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Triton-X-100 al 1% (Fig. 19). Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del Indo-1/AM libre (Sf_2) y unido (Sb_2) al Ca^{2+} en la longitud de onda 2 (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Los datos obtenidos se trasladaron directamente al programa Prism 2.0/GraphPad, donde se graficaron.

Fig. 19. Trazo representativo de estimulación y calibración. Las células que expresan el receptor α_{1b} -adrenérgico humano se incubaron con Indo-1AM, el cual fluoresce al estar en contacto con calcio. Al variar la concentración intracelular de calcio, la fluorescencia del Indo-1AM también cambia. La $[Ca^{2+}]_i$ se calculó a partir de la fluorescencia máxima y mínima a diferentes longitudes de onda (340 y 510 nm de excitación). Después de la estimulación con el agonista se agregó Triton X-100 al 1% para lisar las células y obtener así la fluorescencia máxima. Luego, la fluorescencia mínima se obtuvo al adicionar EGTA 5mM, un quelante de calcio.



- Cuantificación de fosfatos de inositol.

Los fibroblastos confluentes se sembraron en cajas de 6 pozos con medio DMEM complementado con 10% de suero de feto bovino y antibióticos - antimicóticos. Se dejaron crecer las células durante 32 hrs. El medio DMEM se sustituyó por medio DMEM sin inositol, con 1% de suero de feto bovino, con mioinositol tritiado ($5\mu Ci/ml$) 18 a 24 hrs. antes del experimento. El día del experimento se retiró el medio con la marca radiactiva y las células se lavaron 2 veces con una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar el exceso de mioinositol que no haya sido incorporado por las células. Después se incubaron las células durante 20 minutos con una solución de Krebs-HEPES-Glucosa con albúmina sérica bovina al 0.05%, LiCl (cloruro de litio) 10 mM y $CaCl_2$ 1.3 mM a pH 7.4. Posterior a esta incubación, se estimularon las células durante 15 minutos con noradrenalina $10\mu M$ y/o PMA $1\mu M$. La reacción se detuvo por la adición de 0.4ml de ácido perclórico frío al 30% y posteriormente se congelaron las muestras a $-72^{\circ}C$ hasta el día siguiente.

El lisado celular se neutralizó con la adición de una solución de KOH 1.5 M en HEPES 75 mM y se centrifugó durante 10 minutos a 8,500 rpm. Los fosfatos de inositol presentes en el sobrenadante se separaron por cromatografía de intercambio aniónico en columnas Dowex AG1-X8 (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996). La elución y obtención de cada tipo de inositol se realizó utilizando concentraciones crecientes de sales, según el siguiente esquema: para la obtención de IP₁ se eluyó con 5 mM de borato de sodio y 180 mM de formato de sodio; para IP₂ se eluyó con 0.1M de ácido fórmico y 0.4M de formato de amonio; y para obtener el IP₃, se eluyó con una solución de 0.1M de ácido fórmico y 1M de formato de amonio (Berridge *et al.*, 1983). Las cuentas por minuto (CPM) de las fracciones colectadas se obtuvieron en un contador de centelleo Beckman LS6000SE, y los datos de tres experimentos independientes se registraron en las gráficas.

VIII. Resultados

Se estudió la función del receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos. Se cuantificaron los cambios de la $[Ca^{2+}]_i$ y de la producción de los fosfatos de inositol ante la estimulación del receptor con su ligando natural, la noradrenalina (NA). La medición de la $[Ca^{2+}]_i$ se basó en el cambio de fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM a dos longitudes de onda diferentes. La noradrenalina fue capaz de incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ de forma inmediata en las células (**Fig. 20**), produciendo una elevación en la $[Ca^{2+}]_i$ de varios ordenes de magnitud, desde un basal de 100 ± 15 nM hasta $\sim 2\mu M$.

Se realizó una dosis-respuesta para determinar la concentración efectiva del agonista (EC_{50}). La EC_{50} es la concentración que produce el 50% de la respuesta máxima del agonista. El efecto de la noradrenalina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ fue dosis dependiente (**Fig. 21**), provocando una respuesta mínima desde concentraciones de ~ 1 nM, con una EC_{50} de 70 ± 30 nM y una dosis máxima efectiva de $10\mu M$.

Para determinar si el receptor se desensibiliza por la presencia prolongada de su agonista, las células estimuladas una vez con la dosis máxima de noradrenalina, se retaron una segunda vez con el mismo agente a una concentración más elevada, dos minutos después del primer estímulo. Ante el segundo estímulo no se observó ningún cambio en la $[Ca^{2+}]_i$ (**Fig. 22**). Con el propósito de determinar si la falta de respuesta se debía a la desensibilización del receptor o porque las pozas de Ca^{2+} intracelular estaban agotadas, este ensayo se repitió utilizando ácido lisofosfatídico (LPA) como tercer estímulo. El LPA esta acoplado a la vía de señalización de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} y presentó una respuesta muy marcada en la movilización de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano (**Fig. 24**). Posterior a una segunda estimulación con noradrenalina y la estimulación con LPA $1\mu M$, no se observó un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (**Fig. 23**). Esto sugiere que, efectivamente, las pozas de Ca^{2+} intracelular estaban agotadas.

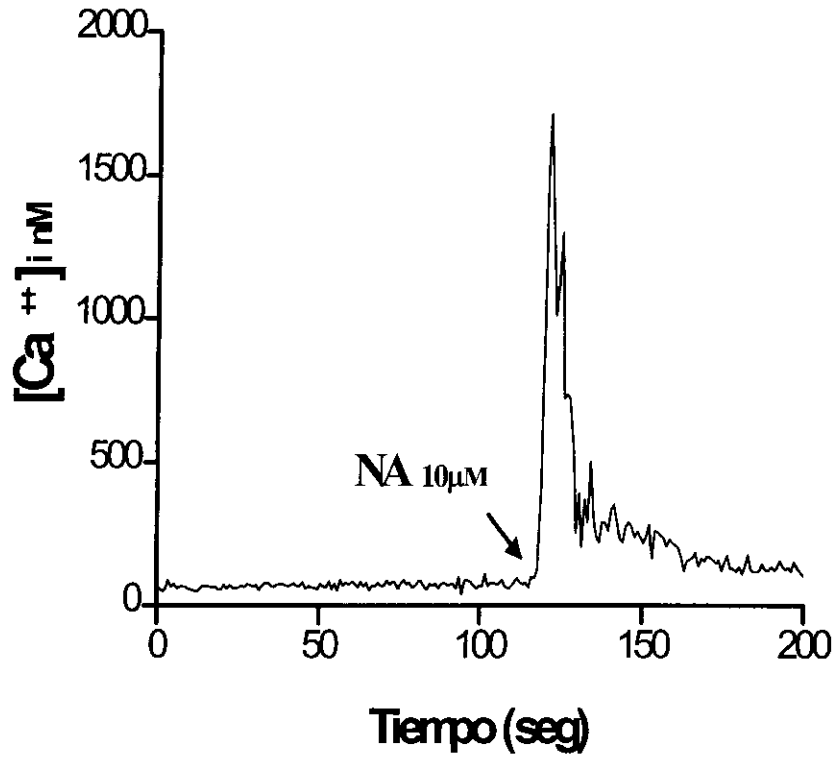


Fig. 20. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la noradrenalina. Para determinar los efectos de la noradrenalina, las células transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico se estimularon con el agonista adrenérgico. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se observó una respuesta marcada en la $[Ca^{2+}]_i$ con una elevación inmediata de varios ordenes de magnitud (con media \pm S.E.M., $n = 7$) y luego una recuperación cerca del nivel basal. Se presenta un trazo representativo.

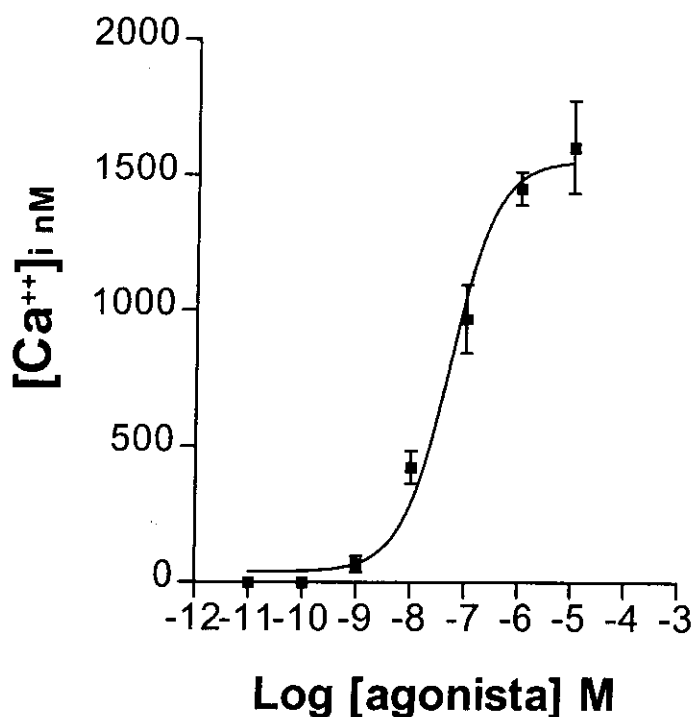


Fig. 21. Efecto de diferentes concentraciones de noradrenalina sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Las células fueron estimuladas con dosis crecientes de noradrenalina, desde 0.01nM hasta 10 μ M. El agonista presentó una respuesta a partir de ~1nM y una dosis máxima de 10 μ M. La EC_{50} se calculó en 70 ± 30 nM para el agonista. Las $[Ca^{2+}]_i$ se midieron a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se representan los promedios con el error estándar de por lo menos tres experimentos independientes para cada punto en la gráfica. 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.

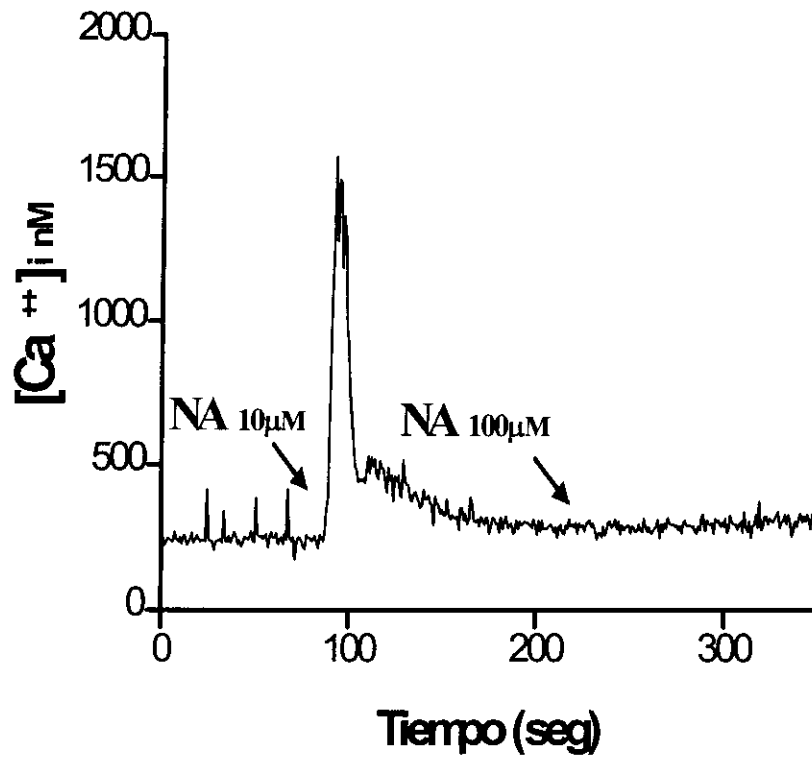


Fig. 22. Bloqueo del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ por un segundo estímulo de noradrenalina. Para determinar si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano se desensibiliza por la presencia prolongada de su agonista, las células estimuladas una vez con la dosis máxima de noradrenalina, se retaron una segunda vez con el mismo agente a una concentración más elevada, dos minutos después del primer estímulo. Ante el segundo estímulo no se observó ningún cambio en la $[Ca^{2+}]_i$. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

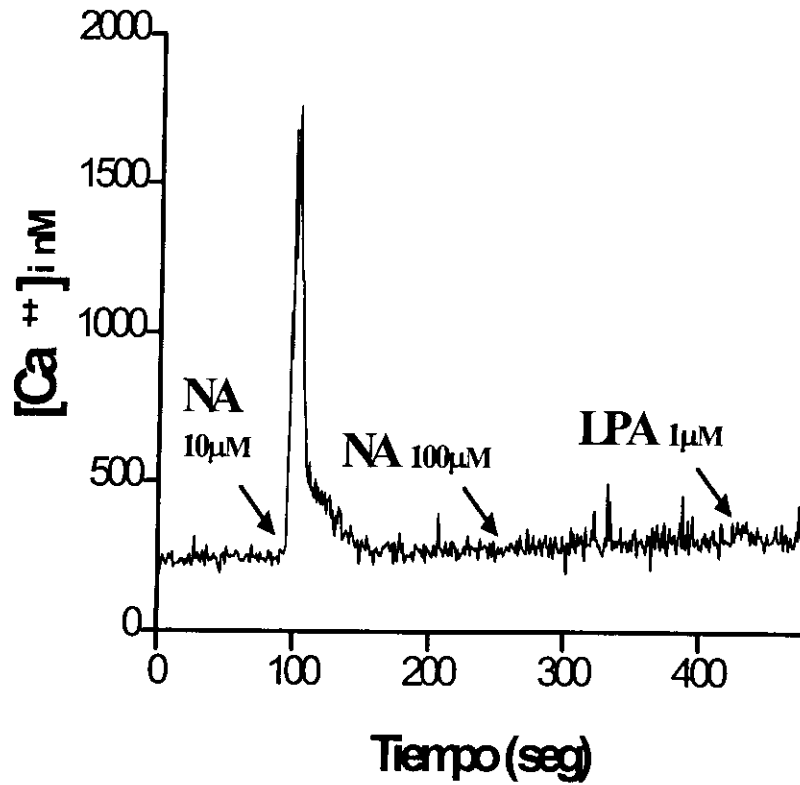


Fig. 23. El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediado por la noradrenalina conduce a la depleción de las pozas de Ca^{2+} intracelular. Con el propósito de determinar si la ausencia de una segunda respuesta de liberación de Ca^{2+} se debía a la desensibilización del receptor o porque las pozas de Ca^{2+} intracelular estaban agotadas, se estimuló a las células retadas con noradrenalina utilizando ácido lisofosfatídico (LPA) como tercer estímulo. El LPA no indujo una liberación de Ca^{2+} intracelular posterior a la liberación del ion por noradrenalina. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

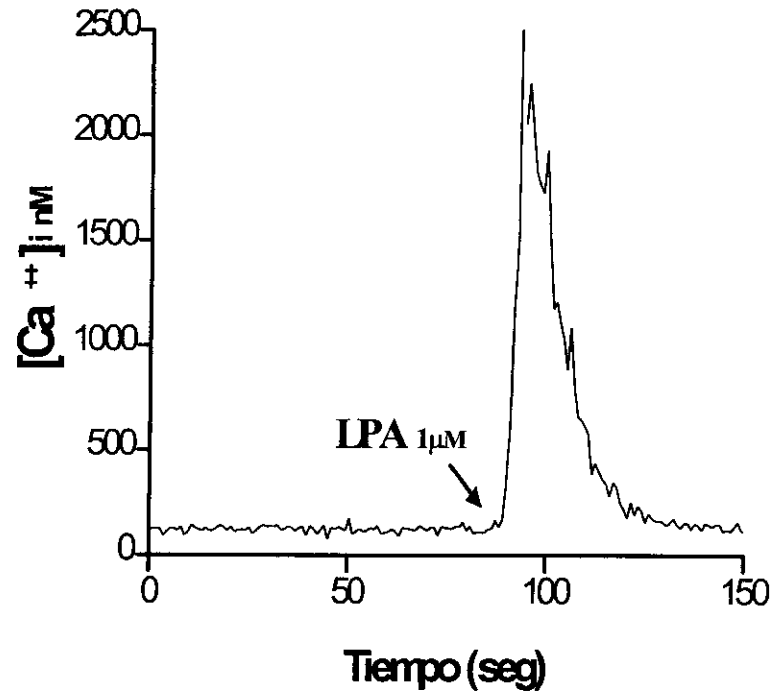


Fig. 24. El LPA es capaz de inducir una respuesta marcada en la [Ca²⁺]_i. La efectividad del LPA para aumentar la [Ca²⁺]_i fue probada en los fibroblastos transfectados con el receptor adrenérgico humano. La estimulación con LPA 1 μM indujo una respuesta mayor en la [Ca²⁺]_i (basal de 100 ± 15 nM, pico máximo de ~2.5 μM) comparada a la respuesta con noradrenalina. La [Ca²⁺]_i se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

Cuando las células se expusieron al PMA, éster de forbol activador de la PKC, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por noradrenalina se bloqueó (Fig. 25). Sin embargo, el PMA no alteró la capacidad de las células para responder al LPA (Fig. 25). El efecto inhibitorio de la PKC fue dosis dependiente, con una inhibición total a partir de PMA $1\mu M$ y una IC_{50} (concentración que produce 50% de la inhibición) de $10 \pm 1nM$ (Fig. 26). Con propósito de verificar que el bloqueo del efecto adrenérgico se debiera a la actividad de la PKC se estudiaron los efectos de un inhibidor específico para la cinasa, el Ro-31-8220. El efecto producido por la activación de la PKC, fue bloqueado por el inhibidor selectivo (Fig.27). Para determinar que este inhibidor no estuviese produciendo ninguna variación en la respuesta directa del receptor adrenérgico, ni en las células, se probó su efecto sobre la movilización de la $[Ca^{2+}]_i$. El inhibidor selectivo de la PKC, Ro-31-8220 no alteró la respuesta adrenérgica (Fig. 28).

Para verificar de manera más contundente que el bloqueo en la respuesta del Ca^{2+} intracelular estuviese mediada por la actividad de la PKC, se preincubaron las células toda la noche anterior con PMA $1\mu M$, para inducir la pérdida de actividad (down regulation) de la PKC. En estas células, el receptor α_{1b} -adrenérgico humano fue capaz de aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la noradrenalina en presencia del PMA (Fig. 29), confirmándonos que en el bloqueo de la respuesta adrenérgica participa la PKC.

Para reforzar estos resultados y asegurar que los efectos observados se debían a la activación de la vía de señalización de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} por el receptor α_{1b} -adrenérgico, se estudiaron los efectos de la noradrenalina y el PMA sobre la producción de fosfatos de inositol. La noradrenalina ($10\mu M$) incrementó de manera significativa la producción de los tres tipos de fosfatos de inositol (IP_1 , IP_2 , IP_3) en las células transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano (Fig. 30). Los fibroblastos expuestos al activador de la PKC, PMA ($1\mu M$), no presentaron alteración en los niveles basales de los fosfatos de inositol, pero si un bloqueo en su aumento ante la estimulación con noradrenalina (Fig. 30), sugiriendo la participación de la PKC en la regulación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano.

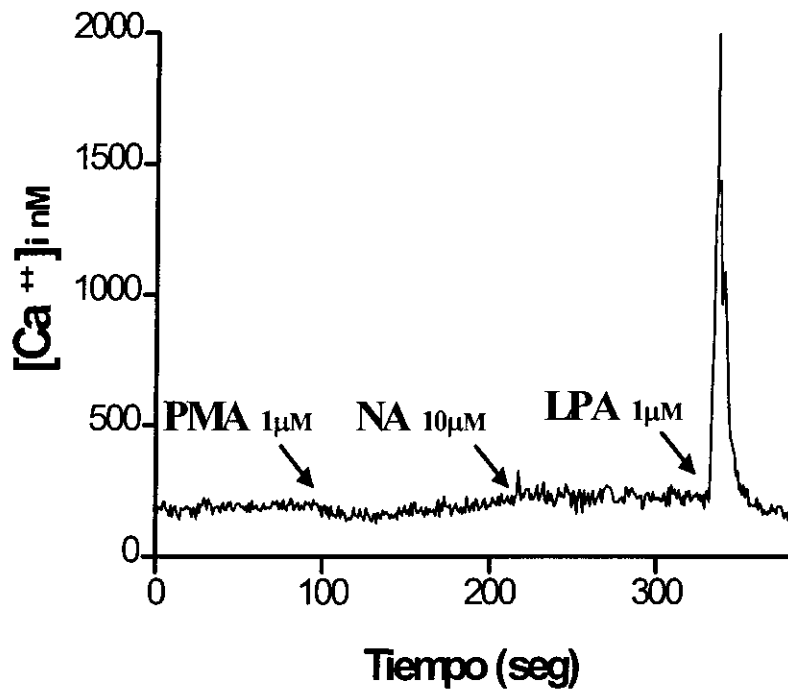


Fig. 25. El activador de la PKC, PMA, fue capaz de bloquear la respuesta de la noradrenalina en los fibroblastos transfectados con el receptor adrenérgico humano. Para estudiar los efectos de la PKC sobre el receptor α_{1b} -adrenérgico humano, se expusieron las células al PMA dos minutos previos a la estimulación con noradrenalina. El PMA bloqueó la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la noradrenalina, sin embargo, no alteró la capacidad de las células para responder al LPA. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

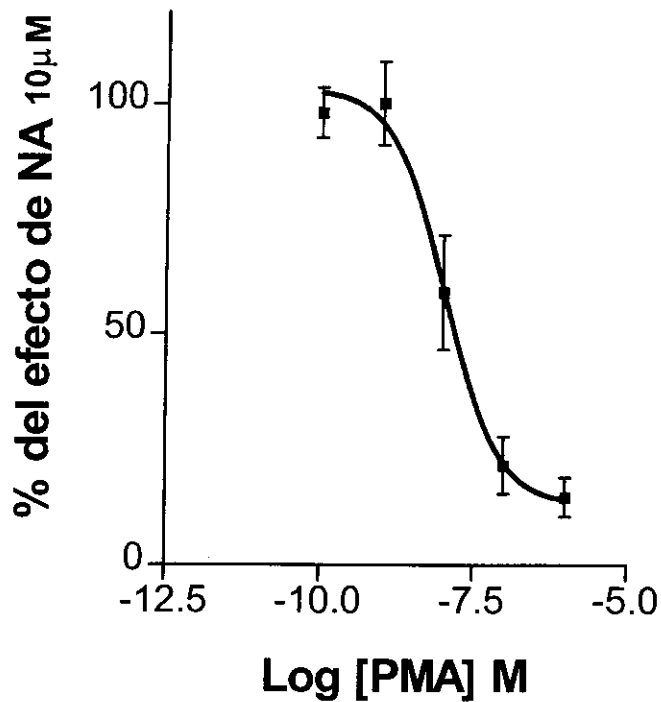


Fig. 26. El bloqueo por el PMA es dosis dependiente. Las células fueron tratadas con dosis crecientes del PMA, desde 0.1nM hasta 10 μ M, para obtener una curva de inhibición. El PMA ocasionó una inhibición total a partir de 1 μ M. Se cálculo la IC₅₀ (concentración que produce 50% de la inhibición) en 10 \pm 1nM (con promedio \pm S.E.M., n = 7). Las [Ca²⁺]_i se midieron a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se representan los promedios con el error estándar de por lo menos tres experimentos independientes para cada punto en la gráfica. 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.

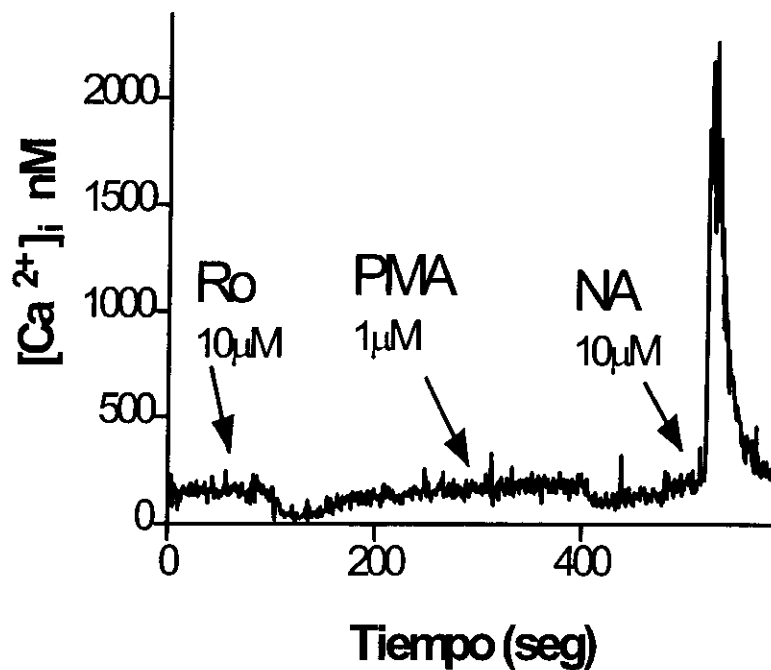


Fig. 27. El inhibidor selectivo a PKC, Ro-31-8220, bloqueó el efecto del PMA. Con propósito de verificar que el bloqueo del efecto adrenérgico se debiera a la actividad de la PKC, se estudiaron los efectos de un inhibidor específico para la cinasa, el Ro-31-8220. El aumento marcado en la $[Ca^{2+}]_i$, ocasionado por la noradrenalina, en presencia de Ro-31-8220 y de PMA demuestra que la activación de la PKC es responsable de la inhibición adrenérgica. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

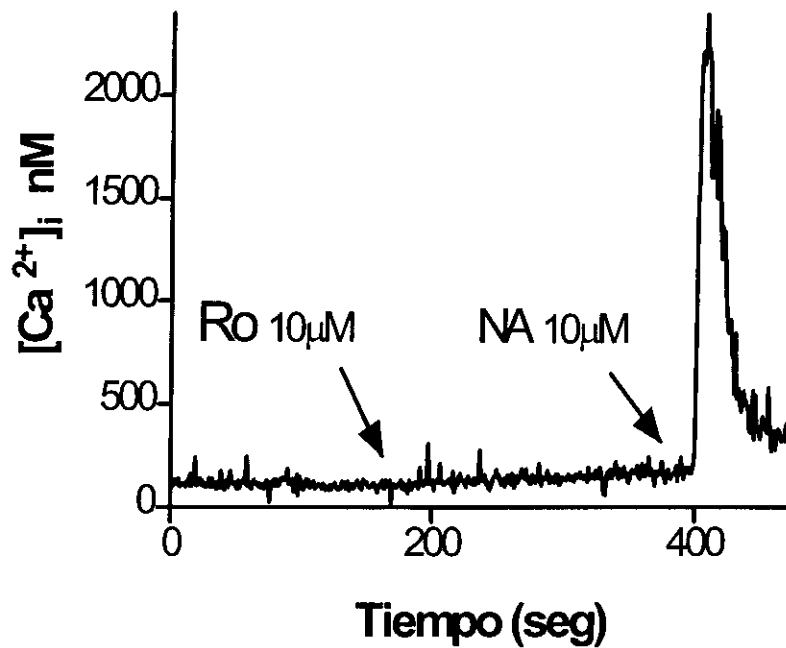


Fig. 28. El Ro-31-8220 no afecta la respuesta adrenérgica en la liberación de Ca^{2+} intracelular. Para determinar que el inhibidor selectivo a la PKC no estuviese produciendo ninguna variación en la respuesta directa del receptor adrenérgico, ni en las células, se probó su efecto sobre la movilización del Ca^{2+} intracelular. El inhibidor selectivo de la PKC, Ro-31-8220, no alteró la respuesta adrenérgica. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se presenta un trazo representativo.

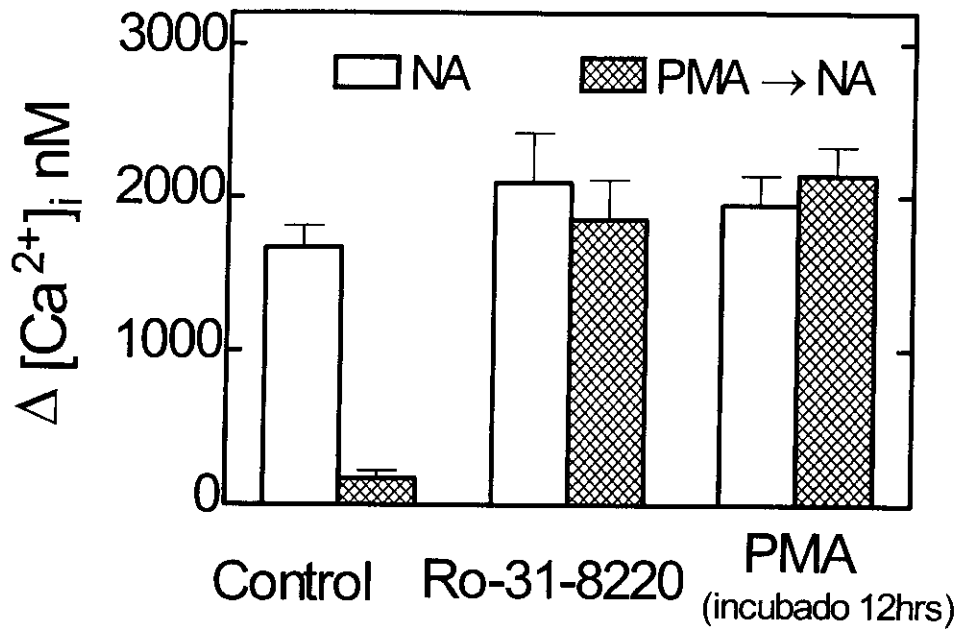


Fig. 29. La pérdida de actividad de la PKC bloqueó el efecto del PMA en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Para verificar de manera más contundente que el bloqueo de la respuesta del aumento de Ca^{2+} intracelular estuviese mediada por la PKC, se preincubaron las células toda la noche anterior con PMA $1\mu M$, para inducir la pérdida de actividad (down regulation) de la PKC. En estas células, el receptor α_{1B} -adrenérgico humano fue capaz de aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a la noradrenalina, en presencia del PMA, confirmándonos que la PKC participa en el bloqueo de la respuesta adrenérgica. Las $[Ca^{2+}]_i$ se midieron a partir de la fluorescencia emitida por el fluoróforo Indo-1AM. Se representan los promedios con el error estándar de por lo menos tres experimentos independientes.

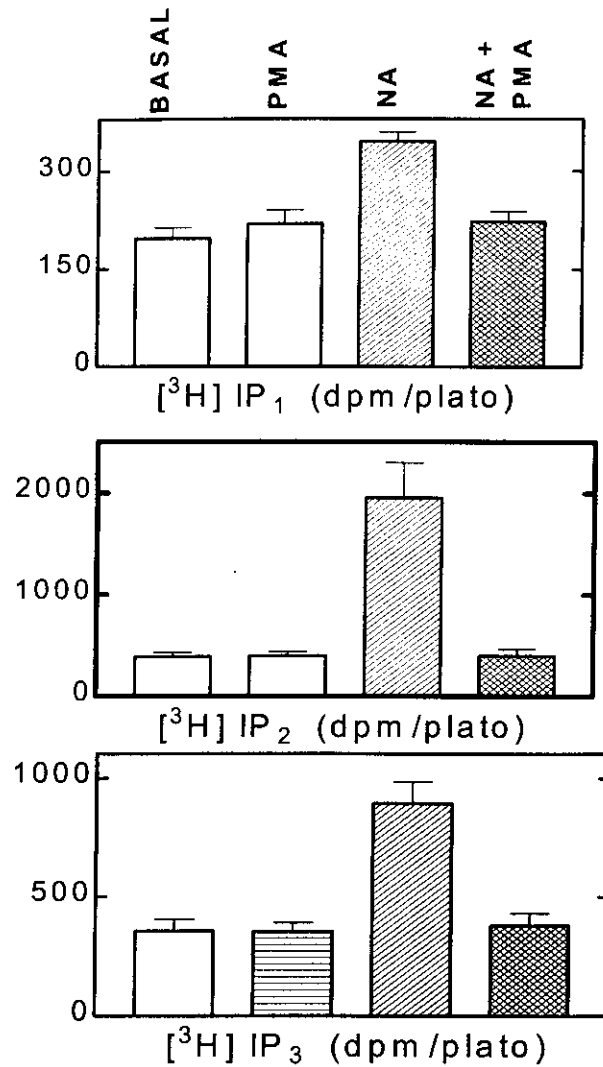


Fig. 30. La noradrenalina (10 μ M) incremento de manera significativa la producci3n de los fosfatos de inositol y este aumento fue bloqueado por la activaci3n de la PKC. Las c3lulas transfectadas fueron incubadas con inositol radiactivo durante 18-24 hrs. para su asimilaci3n. Posterior a la estimulaci3n con noradrenalina y PMA, se lisaron las c3lulas y las muestras fueron sometidas a centrifugaci3n y a una cromatograf3a de intercambio an3nico para aislar a cada uno de los tres tipos de fosfatos de inositol tritiados (³H), IP₁, IP₂ e IP₃. Las muestras de fosfoinositidos fueron cuantificadas utilizando un contador de centelleo y se muestran las desintegraciones / minuto / plato. Se representan los promedios con el error est3ndar de por lo menos tres experimentos independientes.

IX. Discusión

Se llevó a cabo la caracterización funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en la línea CRL-11139 de fibroblastos murinos, midiendo la producción intracelular de los fosfatos de inositol y los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$. Los receptores de siete dominios transmembranales acoplados a las proteínas de la familia $G_{q/11}$ son capaces de activar la vía de señalización intracelular de la fosfolipasa C- β y el recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} . Una manera de evaluar la función de estos receptores es a través de la medición de la producción y movilización de segundos mensajeros, posterior a su estimulación.

Los fibroblastos presentaron un aumento inmediato en la $[Ca^{2+}]_i$ ante la estimulación con noradrenalina. Esta respuesta fue dependiente de la concentración, presentando una dosis efectiva máxima de noradrenalina de $10\mu M$, igual que la que presenta el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. La estimulación con este agonista también indujo la producción de fosfatos de inositol, principalmente la del 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3). Este segundo mensajero es el responsable del aumento de $[Ca^{2+}]_i$, dado que el Ca^{2+} de las pozas intracelulares, principalmente del retículo endoplásmico, es liberado a través de canales activados por el IP_3 (Alberts, 1994).

A través de la producción de fosfatos de inositol inducidos por noradrenalina en las células que expresan el receptor adrenérgico humano fue posible corroborar que los efectos de la noradrenalina observados en la $[Ca^{2+}]_i$ eran debidos a la activación de la fosfolipasa C- β . Siguiendo el modelo de la vía de transducción (Fig. 14), probablemente esta enzima estaba siendo activada por la subunidad $G_{\alpha q}$, posterior a la estimulación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano. La respuesta de la noradrenalina en el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ ocasionada por el receptor adrenérgico de hámster, transfectado en fibroblastos de rata, posee una magnitud cuatro veces menor (con pico máximo de $\sim 400nM$) (García-Sáinz *et al*, 1999a). Otra diferencia es que la recuperación al nivel basal del calcio intracelular es un poco más lenta. Sin embargo, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ observado en las células transfectadas con el receptor adrenérgico de hámster es inmediato, tal como el del receptor humano. Estas diferencias en la magnitud y la duración de la respuesta probablemente se

deban a que los receptores se encuentran transfectados en diferentes tipos celulares. Para determinar si las diferencias se deben al tipo celular o a que los receptores poseen diferencias intrínsecas de respuesta sería necesario realizar un estudio comparativo con ambos receptores transfectados en el mismo tipo celular. Lo que sí es claro, es que el receptor humano y el de hámster se encuentran acoplados a la misma vía de transducción y utilizan al calcio intracelular como un segundo mensajero.

Además de las respuestas relacionadas con la producción de segundos mensajeros, se estudió la regulación por desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico humano, mediada por la activación de la PKC. En estudios previos se comprobó que la producción de segundos mensajeros ocasionada por el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster se bloqueaba por la fosforilación del receptor, inducida por la activación de la PKC (Corvera y García Sáinz, 1984; Corvera *et al.*, 1986). Los resultados del presente estudio demuestran que la activación de la PKC por PMA inhibe, de manera significativa, el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la producción de fosfatos de inositol. En el caso de la $[Ca^{2+}]_i$ esta inhibición es dependiente de la concentración del PMA, lo que indica que la actividad de la PKC es también dosis dependiente del PMA. Dado que el PMA no presentó efectos en la capacidad de las células para aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ (control demostrado con el LPA) este bloqueo de la señalización del receptor probablemente este ocasionado por la actividad de la PKC.

La efectividad del LPA como control positivo de estos experimentos fue determinante para esclarecer que los diferentes inhibidores y activadores de la PKC no tuviesen efecto sobre la capacidad de las células en movilizar el Ca^{2+} intracelular, y que la inhibición de estos procesos estaba siendo mediada por la PKC.

El uso de inhibidores específicos de enzimas ha sido una herramienta muy poderosa para determinar y/o corroborar su participación en diversos procesos celulares. En el presente estudio se utilizó el inhibidor específico de la PKC, Ro-31-8220, para determinar su participación en la desensibilización del receptor α_{1b} -adrenérgico humano. El inhibidor Ro-31-8220 no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de las células a aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ por la noradrenalina, pero sí bloqueó el efecto inhibitorio del PMA. Igualmente, la pérdida de actividad (down regulation) de la PKC impidió el efecto inhibitorio del PMA sobre los aumentos de la $[Ca^{2+}]_i$ sin alterar la capacidad de las células para responder ante la

estimulación con noradrenalina. Estos datos demuestran de manera definitiva que la inhibición observada en la actividad del receptor α_{1b} -adrenérgico humano está mediada por la cinasa dependiente de calcio, PKC.

Es conveniente mencionar que estos datos difieren de los presentados por Yang y Michel, donde reportan que el PMA no ocasiona una desensibilización funcional del receptor α_{1b} -adrenérgico humano (Yang *et al.*, 1999). Considero que se trata de una interpretación errónea de sus datos experimentales, pues ellos observan la pérdida de actividad o de expresión celular del receptor adrenérgico (down regulation) ante una exposición prolongada (24hrs) con su agonista o con PMA. Los resultados de dichos ensayos muestran que posterior a una incubación de 24hrs. con PMA, los receptores α_{1b} -adrenérgicos de humano no presentan ninguna alteración en su capacidad de inducir la producción de fosfatos de inositol.

La exposición prolongada ante el PMA ocasiona la pérdida de actividad de la PKC, y si no hay PKC en la célula, no hay porqué esperar una desensibilización del receptor adrenérgico. Además, si observamos a detalle la vía de transducción de nuestro receptor, la PKC no es indispensable para que el receptor estimulado active a la fosfolipasa-C, induciendo un aumento en los fosfatos de inositol. Por consiguiente, los datos presentados por estos autores son correctos, sin embargo, difiero en su interpretación, pues es claro en el trabajo de esta tesis que el tratamiento agudo con PMA, previa a la estimulación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano, conduce a su desensibilización, pues bloquea su capacidad de aumentar los niveles de fosfatos de inositol y Ca^{2+} intracelular.

En cuanto a la desensibilización mediada por la PKC en la respuesta del receptor α_{1b} -adrenérgico humano, es probable que sea una desensibilización homóloga, ya que posterior a la estimulación con noradrenalina, un segundo estímulo con el mismo agonista no produjo respuesta. En este tipo de células, después de un aumento importante en la $[Ca^{2+}]_i$; la mayor parte del Ca^{2+} es bombeado al espacio extracelular o secuestrado por varios organelos. A este fenómeno se le llama depleción de Ca^{2+} intracelular puesto que el Ca^{2+} ya no está disponible para la célula. Es posible que la ausencia de respuesta al segundo estímulo con adrenalina sea porque las células se encontraban sin Ca^{2+} intracelular, como es

el caso del ensayo con LPA. Sin embargo, si examinamos que al desensibilizar al receptor α_{1b} -adrenérgico humano por estimulación de la PKC, vemos que la respuesta positiva al incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por LPA no se ve afectada.

El hecho de que no se observara una respuesta de $[Ca^{2+}]_i$ por estimulación de las células con LPA inmediatamente posterior a una estimulación con noradrenalina, demuestra que había ocurrido una depleción de las pozas de Ca^{2+} intracelular y que probablemente el receptor a LPA estaba ocupando la misma vía de señalización intracelular que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano. Estos datos indican que, tanto la actividad de la PKC como la depleción de Ca^{2+} intracelular, son componentes responsables de que no hubiese una segunda respuesta ante la noradrenalina y que lo más probable sea que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano se desensibilice de forma homóloga al ser estimulado. Habría que probar si esta desensibilización homóloga está mediada también por GRK's que fosforilan al receptor, como es el caso del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster (Diviani *et al.*, 1996).

Ahora bien, no se excluye la posibilidad de que este receptor sea regulado también por desensibilización heteróloga inducida por la PKC, como generalmente se ha sugerido para el receptor de hámster. Es interesante saber que la fosforilación del receptor de hámster por la actividad de PKC no depende del aumento de Ca^{2+} intracelular (García-Sáinz *et al.*, 1999a), lo que sugiere que la PKC tiene un papel en la desensibilización heteróloga. Para aclarar esta pregunta, y determinar si la PKC ejerce una desensibilización heteróloga sobre el receptor adrenérgico humano, sería necesario realizar estudios donde se midan sus parámetros funcionales, posterior a la activación de otros receptores acoplados a la vía de Gq y activación de la PKC.

La activación de la PKC por PMA $1\mu M$ bloqueó la producción de los fosfatos de inositol e impidió el aumento de la $[Ca^{2+}]_i$. Esto revela que el bloqueo de la vía de transducción ocurre antes de la síntesis de estos segundos mensajeros, por lo que se puede suponer que el bloqueo es a nivel del receptor. El bloqueo ocasionado por la activación de la PKC sobre la vía de señalización del receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster ocurre a este mismo nivel, y se debe a la fosforilación del mismo.

Estudios complementarios realizados en el laboratorio demostraron que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano posee un estado de fosforilación basal y que este estado de fosforilación aumenta ante su activación por agonistas y ante la activación de PKC por PMA (García-Sáinz *et al.*, 1999c). Existe una correlación temporal entre la fosforilación y la desensibilización observada y, además, estos efectos se encuentran asociados al desacoplamiento del receptor con sus proteínas G, como fue observado en estudios de unión con [35 S]GTP- γ -S (García-Sáinz *et al.*, 1999c). Estos datos sugieren que la desensibilización observada sobre el receptor α_{1b} -adrenérgico humano es ocasionada por la fosforilación del receptor, posiblemente en su extremo carboxilo intracelular, como ocurre en el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster (Diviani *et al.*, 1996).

De hecho, existen similitudes estructurales importantes entre el receptor α_{1b} -adrenérgico de humano y el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster. Estudios de secuencia primaria revelan que el receptor recombinante α_{1b} -adrenérgico humano es una proteína de 519 aminoácidos con un peso molecular de 56,778 Da (SWISSPROT: P35368) y que sus tres asas intracelulares poseen 100% de homología a las de la isoforma de hámster. La fosforilación del receptor de hámster ocurre principalmente en residuos de serina y, en menor grado, en residuos de treonina (Vázquez-Prado *et al.*, 1997; Diviani *et al.*, 1997) y se ha demostrado que los sitios de fosforilación por la PKC y por las GRK's se encuentran principalmente en el segmento carboxilo terminal (Lattion *et al.*, 1994; Diviani *et al.*, 1997). La identidad de secuencia de los extremos carboxilo de ambas isoformas es de 89.7%. La isoforma del receptor humano posee un segmento carboxilo terminal mayor por cuatro aminoácidos (en su porción de aminoácidos 341-519 comparada a la 341-515 de la isoforma de hámster); entre ellos: dos argininas adicionales, dos prolinas, una alanina y la ausencia de la serina 369 del receptor de hámster. El dominio que contiene los sitios de fosforilación involucrados en la desensibilización por la PKC y por las GRK's se encuentra presente en ambos receptores y existe un sitio potencial de fosforilación por la PKC en el receptor de hámster, que está ausente en el receptor α_{1b} -adrenérgico humano. Dado que ambos receptores comparten el dominio de fosforilación por la PKC y las GRK's, todo indica que

probablemente el receptor α_{1b} -adrenérgico humano es desensibilizado mediante su fosforilación en estos sitios por la actividad de la PKC.

En el trabajo se determinó a qué vía de transducción está acoplado el receptor α_{1b} -adrenérgico humano y se profundizó en uno de sus mecanismos principales de regulación, la activación de la PKC. Algunos pasos a seguir en la caracterización de este receptor que podrían detallar con más precisión su funcionamiento y regulación deberían de incluir la detección de sustratos de la PKC activada por la vía de recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} tales como otros receptores de membrana, canales y otras cinasas intracelulares. Será interesante también determinar el papel de las GRK's en los procesos de desensibilización de este receptor. Una consideración importante será determinar si el receptor α_{1b} -adrenérgico humano se encuentra acoplado a otras vías de transducción, como la de la adenilato ciclasa y activación de PKA y/o alguna vía de señalización que conduzca a la división celular, activada por enzimas como la PI3K y las MAPK. El uso de diferentes modelos celulares transfectados con este receptor serán de gran utilidad, sin embargo, los estudios que se realicen con células humanas que expresen este receptor de manera endógena nos darán mayor certeza sobre la funcionalidad del receptor α_{1b} -adrenérgico humano y su relevancia fisiológica.

Los receptores acoplados a proteínas G transducen la información proveniente de una gran variedad de estímulos extracelulares. De esta manera, los GPCRs juegan un papel crucial en regular funciones biológicas tales como la fototransducción, olfacción, gusto, función cardiovascular, neurotransmisión y las respuestas a hormonas. La estimulación de estos receptores conduce a la activación de procesos celulares como la secreción, contracción y regulación genética, respuestas que pueden modularse por la desensibilización y reciclamiento de los receptores, y que, son de gran importancia para el buen funcionamiento celular.

La distribución de los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos de humano ha sido poco estudiada, en comparación con los tejidos de roedores, y todo parece indicar que es difícil extrapolar los datos de una especie a otra. Sin embargo, los resultados de este estudio

indican que existe una gran similitud entre las respuestas de los receptores α_{1B} -adrenérgicos de humano y de hámster en la movilización de Ca^{2+} intracelular, la producción de fosfatos de inositol y en su regulación por la PKC. Estudios con los receptores de hámster revelan que las respuestas de los receptores recombinantes se parecen mucho a los endógenos, por lo que es posible que las acciones del receptor α_{1B} -adrenérgico de humano transfectado sean similares a los del receptor endógeno. Estas similitudes abren la posibilidad de estudiar la acción de varios fármacos sobre esta vía de transducción, utilizando receptores transfectados, con posibles aplicaciones terapéuticas.

Hay evidencia de que los receptores α_1 -adrenérgicos de humano juegan papeles importantes en la fisiología y patofisiología humana. Por esto, es importante definir sus propiedades funcionales y un modelo como el receptor α_{1B} -adrenérgico de hámster puede ser útil para ello, dada su similitud funcional. Conocer los aspectos funcionales y regulativos de estos receptores abrirá nuevas ventanas para un conocimiento más detallado y amplio sobre la comunicación celular y también ventanas que nos orienten hacia la aplicación terapéutica de estos conocimientos. Por lo tanto, el estudio de los receptores α_1 -adrenérgicos de humano y sus aspectos funcionales es y será de gran importancia para el futuro cercano.

X. Conclusiones

- La activación del receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos por la noradrenalina resulta en la producción marcada de fosfatos de inositol y un aumento significativo en la $[Ca^{2+}]_i$.
- La PKC, activada por el PMA, bloquea el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ y la producción de fosfatos de inositol inducida por la noradrenalina en las células transfectadas con el receptor α_{1b} -adrenérgico humano.
- Los resultados sugieren que el receptor α_{1b} -adrenérgico humano transfectado en fibroblastos murinos está acoplado principalmente a la vía de transducción del recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} y esta regulado, probablemente, por una desensibilización homóloga inducida por la PKC.
- El receptor α_{1b} -adrenérgico humano ejerce su función principalmente por la acoplación de proteínas de la familia Gq/11, conduciendo a la vía de señalización de la fosfolipasa C- β , recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} y activación de la PKC en los fibroblastos murinos que lo expresan.
- El receptor α_{1b} -adrenérgico humano tiene un alto nivel de similitud funcional con el receptor α_{1b} -adrenérgico de hámster en lo concerniente a la movilización de Ca^{2+} intracelular, producción de fosfatos de inositol y su regulación por la actividad de la PKC.

XI. Índice de Tablas y Figuras

	Página
Figuras	
Fig. 1	Tres tipos de comunicación: autocrina, paracrina y endocrina. 7.
Fig. 2	Sistema de comunicación celular: mensajero, receptor, efector, segundo mensajero, etc. Efectos sobre metabolismo, contracción, secreción y expresión de genes en núcleo. 10.
Fig. 3	Tres tipos de receptores en la membrana plasmática: receptores canal, receptores con actividad enzimática y GPCRs. 16.
Fig. 4	Esquema de un receptor de siete dominios transmembranales. 18.
Fig. 5	Ciclo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas. 20.
Fig. 6	Vía de transducción de la adenilato ciclasa. 22.
Fig. 7	Catecolaminas principales: dopamina, noradrenalina. 30.
Fig. 8	Vía de síntesis de la adrenalina y noradrenalina. 33.
Fig. 9	Esquema detallado de los receptores adrenérgicos. 36.
Fig. 10	Regulación del metabolismo de la glucosa en músculo por el receptor β -adrenérgico. 40.
Fig. 11	Vía de la fosfolipasa C- β y recambio de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} 44.
Fig. 12	Respuesta de la movilización del Ca^{2+} intracelular. 45.
Fig. 13	Ciclo de los fosfatos de inositol. 46.
Fig. 14	Cinética del efecto inhibitorio de la PKC sobre la respuesta de los receptores α_1 -adrenérgicos. 48.
Fig. 15	Esquematación de desensibilización homóloga y heteróloga. 53.
Fig. 16	Mecanismos moleculares de fosforilación e internalización de GPCRs. ... 54.
Fig. 17	Receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico con sitios de fosforilación de PKC y GRKs. 56.
Fig. 18	Diseño Experimental. 64.
Fig. 19	Trazo de calibración para determinación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 67.
Resultados	
Fig. 20	Respuesta de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ante la noradrenalina (NA) mediada por el receptor $\alpha_{1\beta}$ -adrenérgico humano. 70.
Fig. 21	Efecto de diferentes concentraciones de noradrenalina sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 71.
Fig. 22	Bloqueo del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por un segundo estímulo de NA. 72.
Fig. 23	Bloqueo del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ante un tercer estímulo con LPA. 73.
Fig. 24	Respuesta de movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por LPA $1\mu\text{M}$ 74.
Fig. 25	Bloqueo del aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por el activador de la PKC, PMA. 76.
Fig. 26	El bloqueo por PMA es dosis dependiente, con IC_{50} de $10 \pm 1\text{nM}$ 77.
Fig. 27	El inhibidor selectivo a la PKC, Ro-31-8220, bloqueó el efecto del PMA. 78.
Fig. 28	El inhibidor selectivo a la PKC, Ro-31-8220, no alteró la respuesta de Ca^{2+} intracelular por NA. 79.

Fig. 29	Bloqueo del efecto de la PKC en el aumento de $[Ca^{2+}]_i$ por pérdida de actividad (down regulation) de la PKC en células pre-incubadas con PMA durante 12 hrs.	80.
Fig. 30	La noradrenalina ($10\mu M$) incrementó de manera significativa la producción de los tres tipos de fosfatos de inositol tritiados, $[^3H]$ IP ₁ , IP ₂ e IP ₃ , y el PMA bloqueó esta respuesta de manera significativa.	81.

Tablas

Tabla 1:	Tipos de mensajeros químicos que se clasifican dependiendo de su naturaleza y estructura química, de su lugar de origen, por sus efectos y por sus mecanismos de acción.	4.
Tabla 2:	Ejemplos de glándulas endocrinas del cuerpo, sus hormonas y funciones. ..	9.
Tabla 3:	Principales dominios funcionales encontrados en proteínas y su función.	12.
Tabla 4:	Efectos mediados por el AMPc.	23.
Tabla 5:	Procesos fisiológicos regulados por los receptores adrenérgicos.	37.

XII. Lista de Abreviaciones

AMPc	Adenosina 5' monofosfato cíclico
ATP	Adenosina 5'trifosfato
Ca ²⁺	Ion calcio
Cys	Cisteina
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EC ₅₀	Dosis efectiva 50
G α	Subunidad alfa de una proteína G heterotrimérica
G $\beta\gamma$	Subunidad beta-gama de una proteína G heterotrimérica
GDP	Guanosina 5'difosfato
GMPc	Guanosina 5' monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G heterotriméricas
GRK	Cinasa de receptor acoplado a proteínas G
GTP	Guanosina 5'trifosfato
IC ₅₀	Dosis inhibitoria 50
IP ₁	Inositol fosfato
IP ₂	Inositol 1,5-bifosfato
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
LPA	Ácido lisofosfatídico
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
NA	Noradrenalina
PBS	Solución salina con amortiguador de fosfatos
PI3K	Cinasa de fosfatidilinositol 1,4,5-trifosfato
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5'bifosfato
PMA	Forbol miristato acetato
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC- γ	Fosfolipasa C - gama
Proteína G	Proteína que hidroliza GTP
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

XIII. Referencias

- Adam, L., Bouvier, M., and Jones, T. L. Z. (1999) *Nitric Oxide Modulates β_2 -Adrenergic Receptor Palmitoylation and Signaling*. J Biol Chem. Vol.274, 37:26337-26343.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Ed. Garland Publishing Inc. New York, USA.
- Allen, L.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., and Cotecchia, S. (1991) *G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 24:11354-11358.
- Atkins, P.W. 1987. *Molecules*. Scientific American Library. New York, U.S.A.
- Awaji, T., Hirasawa, A., Kataoka, M., Shinoura, H., Nakayama, Y., Sugawara, T., Izumi, S.I., and Tsujimoto G. (1998) *Real-time optical monitoring of ligand-mediated internalization of α_{1B} -adrenoceptor with green fluorescent protein*. Mol Endocrinology. 12:1099-1111.
- Benovic, J.L., Strasser, R.H., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1986) *Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:2797-2801.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, P., Heslop, J.P., and Irvine, R.F. (1983) *Changes of the of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospholipids*. Biochem J. 212:473-482.
- Bourne, H.R. (1995) *Team blue sees red*. Nature. 376:727-729.
- Casas-González, P., Vázquez-Prado, J., and García-Sáinz J.A. (2000) *Lysophosphatidic Acid Modulates α_{1B} -Adrenoceptor Phosphorylation and Function: Roles of Gi and Phosphoinositide 3-Kinase*. Mol Pharmacol. 57:1027-1033.
- Corvera, S. and García-Sáinz J.A. (1984) *Phorbol esters inhibit alpha1 adrenergic stimulation of glycolysis in isolated rat hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun. 119(3): 1128-1133.c
- Corvera, S., Schwarz, K.R., Graham, R.M. and García-Sáinz J.A. (1986) *Phorbol esters inhibit alpha1-adrenergic effects and decrease the affinity of liver cell alpha1-adrenergic receptors for (-) epinephrine*. J Biol Chem. Vol. 261, 2:520-526.

- Cotecchia S., Kobilka B.K., Daniel K.W., Nolan R.D., Lapetina E.Y., Caron M.G., Lefkowitz R.J., and Regan J.W. (1990) *Multiple second messenger pathways of α -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells*. J Biol Chem. Vol. 265, 1:63-69.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Larbi, N., Kunapuli, P., Pronin, A., Benovic, J.L., and Cotecchia, S. (1996) *Effect of Different G Protein-coupled Receptor Kinases on Phosphorylation and Desensitization of the α_{1b} -Adrenergic Receptor*. J Biol Chem. Vol. 271, 9:5049-5058.
- Diviani, D., Lattion, A.L., Cotecchia, S. (1997) *Characterization of the Phosphorylation Sites Involved in G Protein-coupled Receptor Kinase- and Protein Kinase C-mediated Desensitization of the α_{1b} -Adrenergic Receptor*. J Biol Chem. Vol. 272, 45:28712-28719.
- Eguchi, S., Iwasaki, H., Ueno, H., Frank, G.D., Motley, E.D., Eguchi, K., Marumo, F., Hirata, Y., and Inagami, T. (1999) *Intracellular Signaling of Angiotensin II-induced p70 S6 Kinase Phosphorylation at Ser⁴¹¹ in Vascular Smooth Muscle Cells*. J Biol Chem. Vol.274. 52:36843-36851.
- Exton, J. H. (1994) *Phosphoinositide Phospholipases and G Proteins in Hormone Action*. Annu. Rev. Physiol. 56:349-369.
- Exton, J. H. (1998) *Small GTPases Minireview Series*. J Biol Chem. Vol. 273, 32:19923.
- Ferguson, S.S.G, Downey III, W.E., Colapietro, A.M., Barak, L.S., Menard, L., and Caron, M.G. (1996). Science. 271. 363-366.
- Ferguson, S.S.G, Zhang, J., Barak, L.S., Menard, L., and Caron, M.G. (1997) *Molecular Mechanisms of G Protein-Coupled Receptor Desensitization and Resensitization*. Life Sciences. Vol. 62. 17/18:1561-1565.
- García Sáinz J. (1995) *Adrenaline and its Receptors: One Hundred Years of Research*. Archives of Medical Research. Vol. 26, 3:205-212.
- García Sáinz J. 1998 *Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular*. 3^{era} edición. Fondo de Cultura Económica. México, DF. México.
- García Sáinz J., Mendoza-Mendoza, A. and Vázquez-Prado, J. (1999a) *Intracelular Calcium and α_{1b} -Adrenoceptor Phosphorylation*. Archives of Medical Research, 30:353-357.
- García Sáinz J., Vázquez-Prado, J. and Villalobos-Molina, R. (1999b) Review Article *α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease*. Archives of Medical Research, 30:449-458.

- García-Sáinz J., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado J., and Romero-Avila, M.T. (1999c) *Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} -adrenoceptors*. *European Journal of Pharmacology*. 385:263-271.
- García Sáinz J., Vázquez-Prado J., Medina, L.del C. (2000). Review. *α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorilation*. Review. *European Journal of Pharmacology*. 389:1-12.
- Goldstein, D.V., Einsenhofer, G., and McCarthy, R. (1998). *Catecholamines. Bridging Basic Science with Clinical Medicine. Advances in Pharmacology*. Academic Press, USA.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R.Y. (1985) *A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties*. *J Biol Chem*. Vol. 260, 6:3440-3450.
- Hamm, H.E. and Gilchrist, A. (1996). *Heterotrimeric G proteins*. *Current Opinion in Cell Biology*. 8:189-196.
- Hausdorff, W. P., Caron, M.G. and Lefkowitz, R. J. (1990) *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function*. *FASEB J*. 4:2881-2889.
- Hausdorff, W.P., Bouvier, M., O'Dowd, B.F., Irons, G.P., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1989) *Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization*. *J Biol Chem*. Vol. 264, 21:12657-12665.
- Houslay, M.D. (1992) *G-protein linked receptors: a family probed by molecular cloning and mutagenesis procedures*. Review. *Clin. Endocrinol*. 36. 6:525-534.
- Hurley, J. H. (1999) *Structure, Mechanism, and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclase*. *Minireview*. *J Biol Chem*. Vol. 274, 12:7599-7602.
- Iacovelli, L., Sallese, M., Mariggio, S., and De Blasi, A. (1999) *Regulation of G-protein coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins*. *FASEB J*. 13:1-8.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Wao, W.J., Johnson, M., Gunwalsden, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A., and Gerald, C. (1998) *GABA_B receptors function as a heterotrimeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2*. *Nature*. Vol. 369:674-678.
- Kaufman, C. E. Jr., Papper, S. 1983. *Review of Pathophysiology*. Little, Brown and Company. Boston, U.S.A.

- Kleuss C., Scherübl, H., Hescheler, J., Schultz, G., Wittig, B. (1993) *Selectivity in Signal Transduction Determined by γ Subunits of Heterotrimeric G Proteins*. Science. Vol. 259: 832-834.
- Koch W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., and Lefkowitz, R.J. (1994) *Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by $G_{\beta\gamma}$ activation of p21^{ras}*. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:12706-12710.
- Landsberg, L. and Young, J.B. (1985) CH. 23 *Catecholamines and the Adrenal Medulla*. Wilson, J.D. and Foster, D.W. (1985) Williams Textbook of Endocrinology 7th Ed. W.B. Saunders Company. USA.
- Lattion, A.L., Diviani, D., and Cotecchia S. (1994) J Biol Chem. Vol. 269, 22887-22893.
- Llahi S. and Fain J.N. (1992) *α_1 -Adrenergic receptor-mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex*. J Biol Chem. Vol. 267:3679-3685.
- Lefkowitz, R.J., Pitcher, J., Krueger, K., and Daaka, Y. (1998) *Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization*. Adv. Pharmacol. 42:416-420.
- McCune, D.F., Edelmann, S.E., Olges, J.R., Post, G.R., Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J., Perez, D.M., and Piascik, M.T. (2000) *Regulation of the Cellular Localization and Signaling Properties of the α_{1B} - and α_{1D} -Adrenoceptors by Agonists and Inverse Agonists*. Mol Pharmacol. 57:659-666.
- Matozaki, T. and Kasuga, M. (1996) Mini Review. *Roles of Protein-Tyrosine Phosphatases in Growth Factor Signalling*. Cell Signal, Vol. 8, 1:13-19.
- Medina, L.C., Vázquez-Prado, J., Torres-Padilla, M.E., Mendoza-Mendoza A., Cruz Muñoz, M.E., and García-Sáinz, J.A. (1998) *Crosstalk: phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors induced through activation of bradykinin B2 receptors*. FEBS Lett. 422 (2):141-145.
- Minneman, K.P., Lee, D., Zhong, H., Berts, A., Abbott, K.L., and Murphy, T.J. (2000) *Transcriptional Responses to Growth Factor and G Protein-Coupled Receptors in PC12 Cells: Comparison of α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes*. J Neurochem. 74:2392-2400.
- Sallese, L. Mariggio, S., D'Urbano, E., Iancovelli, L., and De Blasi, A. (2000) *Selective Regulation of G_q Signaling by G Protein-Coupled Receptor Kinase 2: Direct Interaction of Kinase N Terminus with Activated $G_{\alpha q}$* . Mol Pharmacol. 57:826-831.
- Tolbert, L. M. and Lameh, J. (1996) *Human muscarinic receptor Hm1 internalizes via clathrin-coated vesicles*. J Biol Chem. Vol. 271, 29:17335-17342.

- Ueyama, T., Zhu, C., Valenzuela, Y.M., Suzow, J.G., and Stewart, A.F.R. (2000) *Identification of the Functional Domain in the Transcription Factor RTEF-1 That Mediates α_1 -Adrenergic Signaling in Hypertrophied Cardiac Myocytes*. J Biol Chem. Vol. 275, 23:17476-17480.
- Ullrich, A. (1999) Review. *G-Protein Coupled Receptors*. Tips 20: 409.
- Valverde-R., Carlos. 1997 *Intercomunicación celular. Una red bioinformática intra- e intersistémica*. En "Curso Internacional Precongreso Actualización en Fisiología" Pp. 7-12. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.
- Vázquez-Prado, J. and García-Sáinz J.A. (1996) *Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes*. Mol Pharmacol. 50:17-22.
- Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., and García-Sáinz J.A. (1997) *Activation of endothelin ET_A receptors induce phosphorylation of α_{1B} -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts*. J Biol Chem. Vol. 272, 27330-27337.
- Voet, D., Voet, J. G. 1995. *Biochemistry*. 2nd Ed. Jonh Wiley and Sons, Inc. New York, U.S.A.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M., and Marshal, F.H. (1998) *Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA_B receptor*. Nature. Vol. 396:679-682.
- Williams, Roger L. (1999) Review. *Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C*. Biochimica et Biophysica Acta 1441: 255-267.
- Yang, M., Ruan, J., Voller, M., Schalken, J., and Michel, M.C. (1999) *Differential regulation of human α_1 -adrenoceptor subtypes*. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 359: 439-446.
- Yarden, J. and Ullrich, A. (1988) *Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases*. Annual Review of Biochemistry. 57: 443-478.
- Zhang, J., Barak, L.S., Winkler, K.E., Caron, M.G., Ferguson, S.S.G. (1997). *A central role for β -arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in β_2 -adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types*. J Biol Chem. Vol. 272, 43:27005-27014.