



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de Exámenes Profesionales

"VIAS DE SEÑALIZACION DE LOS RECEPTORES α- Y β-ADRENERGICOS, MUSCARINICOS Y DE DOPAMINA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
JUAN JOSE MAZARIEGOS TRUJILLO

ASESOR: M. en C. LUISA MARTINEZ AGUILAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

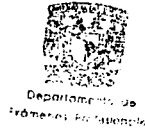


UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Vías de señalización de los receptores alfa y beta
adrenérgicos, muscarínicos y de dopamina

que presenta el pasante: Juan José Mazariegos Truillo
con número de cuenta: 9250853-6 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de noviembre de 2001

PRESIDENTE

Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

VOCAL

Q.F.B. Maricela Noé Martínez

SECRETARIO

M. en C. Luisa Martínez Aguilar

PRIMER SUPLENTE

M. en F.C. Cecilia Hernández Barba

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Tais Nopal Guerrero

[Firmas manuscritas de los miembros del tribunal]

A MIS PADRES

JOSÉ MAZARIEGOS MALDONADO

Y

MARÍA DE JESÚS TRUJILLO DE MAZARIEGOS

AGRADECIMIENTOS

DESEO AGRADECER A MIS PADRES LA CONFIANZA QUE HAN PUESTO EN MI Y EL GRAN APOYO QUE AUN SIGUEN BRINDANDOME. AL SACERDOTE LOREN RIEBE POR SU GENEROSIDAD Y POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE ESTUDIAR. A YASHALUM DE SANTIAGO APOSTOL A.C. POR SU INFINITA PACIENCIA. A RICHARD Y ANN HINCHION Y ARNOLD Y BARBARA HABIG POR TODA SU AYUDA. A MIS HERMANOS CHUS, CHELO, LUVI Y CÉSAR POR SU APOYO Y CONFIANZA. A MI CUÑADO GABRIEL. A MIS AMIGOS OSCAR, ANTONIO, JUAN, RÉGULO Y ROLANDO POR SU AMISTAD. A LA FAMILIA CÁRDENAS ALVARADO. A LA MAESTRA LUISA Y A TODOS MIS PROFESORES, ASÍ COMO A MIS AMIGOS DE ESTA FACULTAD.

AGRADEZCO ESPECIALMENTE A BELEM POR SU APOYO EN LA TRADUCCIÓN Y REDACCIÓN, ASÍ COMO POR SU COMPAÑÍA A LO LARGO DEL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

Corpora non agunt nisi fixata
(Las sustancias no actúan a menos de que se fijen)
Paul Ehrlich, 1913

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	3
I. GENERALIDADES	4
1. Mecanismos de acción de los fármacos	4
2. Comunicación celular	5
3. Receptores	6
4. Proteínas G	11
II. Los receptores y sus vías de señalización	18
1. Vía de adenililciclasa	18
2. Vía del fosfatidilinositol	20
3. Receptores adrenérgicos α	21
3.1. Definición	21
3.2. Vías de señalización	24
3.2.1. Vías de señalización de receptores adrenérgicos α_1	24
3.2.1.1. Vía del fosfatidilinositol	24
3.2.1.2. Vía de adenililciclasa	25
3.2.1.3. Activación de fosfolipasa D y fosfolipasa A_2	26
3.2.1.4. Vías mitogénicas	28
3.2.1.5. Modulación de canales iónicos	31
4. Receptores adrenérgicos β	33
4.1. Definición	33
4.2. Vías de señalización	34
4.2.1. Vía de adenililciclasa	35
4.2.2. Hidrólisis del fosfatidilinositol	36
4.2.3. Modulación de canales iónicos	36
4.2.3.1. Canales de Ca^{2+}	36
4.2.3.2. Canales de K^+	37
4.2.3.3. Canales de Cl^-	38
4.2.3.4. Intercambiador Na^+/H^+	39
4.2.4. Vías mitogénicas	41

5. Receptores muscarínicos	46
5.1. Definición	46
5.2. Vías de señalización	48
5.2.1. Vías de adenililciclasa y fosfatidilinositol	49
5.2.2. Activación de PLD y PLA ₂	50
5.2.3. Modulación de canales iónicos	51
5.2.3.1. Canales de Ca ²⁺ independientes de voltaje	51
5.2.3.2. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	53
5.2.3.3. Canales catiónicos no selectivos	56
5.2.3.4. Canales de K ⁺	56
5.2.4. Vía mitogénica	62
5.2.5. Receptores muscarínicos presinápticos	67
6. Receptores de dopamina	70
6.1. Definición	70
6.2. Vías de señalización	73
6.2.1. Adenililciclasa	73
6.2.2. Hidrólisis de fosfatidilinositol	74
6.2.3. Canales iónicos	78
6.2.4. Liberación de ácido araquidónico	79
6.2.5. Vía mitogénica	79
6.2.6. Acoplamiento a proteínas G	79
DISCUSION	81
CONCLUSIONES	84
GLOSARIO	85
BIBLIOGRAFIA	92

INDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS

Parte I Generalidades

Tabla 1.1 Macromoléculas con las que interactúan los fármacos	4
Tabla 1.2 Clasificación de fármacos que actúan por sus propiedades fisicoquímicas	4
Tabla 2.1 Formas de comunicación celular	5
Tabla 2.2 Mensajeros celulares	6
Tabla 3.1 Receptores clonados y expresados	7
Tabla 3.2 Clasificación de los receptores	8
Esquema 3.1 Transducción de señales por el receptor acoplado a proteína G	13
Esquema 3.2 Estructura de adenililciclasa	14
Esquema 3.3 Activación de MAPK	16
Esquema 3.4 Vía mitogénica activada por receptores tirosina cinasa	17
Figura 3.1 Modelo de receptor acoplado a proteína G	10
Tabla 4.1 Clasificación de proteínas G	12

Parte II Los receptores y sus vías de señalización

Esquema 1.1 Vía de adenililciclasa	19
Esquema 2.1 Vía del fosfatidilinositol	21
Esquema 3.1 Clasificación de los receptores adrenérgicos α	22
Esquema 3.2 Activación de PLA_2	27
Esquema 3.3 Vía mitogénica activada por PKC	28
Esquema 3.4 Vía mitogénica activada por PKA	29
Esquema 3.5 Vía mitogénica activada por PI3K	30
Esquema 3.6 Vía mitogénica activada por otras estructuras	31
Esquema 3.7 Apertura de canales iónicos	32
Fig. 3.1 Modelo de receptor α_{1D} de bovino	23
Esquema 4.1 Activación del canal de Ca^{2+} tipo L	37
Esquema 4.2 Activación del canal de K_{Ca}	38
Esquema 4.3 Activación de canales de Cl^-	39
Esquema 4.4 Activación del intercambiador Na^+/H^+	40
Esquema 4.5 Modulación del intercambiador Na^+/H^+ y del transportador Na^+/HCO_3^-	40
Esquema 4.6 Vía mitogénica activada por PKA y por G_i	42
Esquema 4.7 Vía mitogénica activada por PKA a través de Src	43
Esquema 4.8 Activación de la vía mitogénica por PKC	43
Esquema 4.9 Vía mitogénica en hipocampo de rata	45
Figura 4.1 Modelo plegado de receptor adrenérgico β	34
Esquema 5.1 Activación de PLA_2 y PLD	51
Esquema 5.2 Activación de canales de Ca^{2+} independientes de voltaje	53
Esquema 5.3 Inhibición de canales de Ca^{2+} operados por voltaje	54
Esquema 5.4 Activación de canales de Ca^{2+} operados por voltaje	55

Esquema 5.5 Activación de guanilato ciclasa	55
Esquema 5.6 Inhibición del canal de K_M por Ca^{2+}	57
Esquema 5.7 Inhibición del canal K_{Ca}	58
Esquema 5.8 Inhibición del canal K_{IR}	58
Esquema 5.9 Inhibición del canal K_{IR} de corriente lenta	59
Esquema 5.10 Activación del canal K_{IR} vía G_i	60
Esquema 5.11 Inhibición del canal K_{IR} por inhibición de adenililciclasa	60
Esquema 5.12 Inhibición del canal K_{Ca} por G_i o G_o	62
Esquema 5.13 Activación de las vías MAPK y JNK	64
Esquema 5.14 Inhibición de la vía mitogénica por PKA	66
Esquema 5.15 Vía mitogénica activada en hipocampo de rata	66
Esquema 5.16 Receptores muscarínicos presinápticos	68
Esquema 5.17 Señalización del receptor M_1 facilitatorio presináptico	69
Figura 5.1 Modelo desplegado de receptor muscarínico	48
Figura 5.2 Arreglo de los dominios transmembranales del receptor muscarínico	48
Esquema 6.1 Clasificación de receptores de dopamina	70
Esquema 6.2 Señalización receptores D_1 y D_2 en fibroblastos Ltk de ratón y en células GH4C1	75
Esquema 6.3 Inhibición de canales de Ca^{2+} tipo L por acción de calcineurina	76
Esquema 6.4 Inhibición del intercambiador Na^+/H^+ y la bomba ATPasa de Na^+/K^+	78
Tabla 6.1 Proteínas G que se acoplan a receptores dopaminérgicos	79
Tabla 6.2 Efectores modulados por proteínas G	80
Figura 6.1 Modelo de receptor dopaminérgico D_1 de humano	71
Figura 6.2 Modelo de receptor dopaminérgico D_2 de humano	71

INTRODUCCIÓN

La Gran mayoría de fármacos actúan por virtud de su interacción específica con distintas macromoléculas presentes en las células del organismo, tales como: receptores, enzimas, sistemas de transporte y componentes macromoleculares del aparato genético. El conocimiento de los mecanismos moleculares mediante los cuales se llevan a cabo diversos procesos fisiológicos, los cuales son modificados por los fármacos, nos ayuda a comprender el mecanismo de acción de éstos. Una gran cantidad de fármacos producen sus efectos por interacción con receptores específicos, los cuales al ser activados desencadenan distintas vías de transducción de señales.

Los receptores son proteínas localizadas en la membrana plasmática y el citoplasma, son capaces de interactuar con sustancias endógenas como neurotransmisores, hormonas, autacoides y factores de crecimiento. Se han caracterizado una gran variedad de receptores que por su estructura y función se agrupan en:

- ◆ Receptores con actividad de canales iónicos
- ◆ Receptores que se acoplan a proteínas G
- ◆ Receptores con actividad enzimática
- ◆ Receptores con actividad transcripcional

En el caso de la señalización de los receptores que se acoplan a proteínas G, ésta inicia cuando la señal extracelular -sustancia endógena o fármaco- establece enlaces químicos con el receptor, el cual sufre modificaciones conformacionales que constituyen su activación, fenómeno que permite su acoplamiento a estructuras como las proteínas G que funcionan como transductores ^{5, 7, 14, 23}.

Los transductores tienen la función importante de activar sistemas efectores, tales como adenililciclase y fosfolipasa C, enzimas que catalizan la formación de segundos mensajeros. La transmisión de la señal al interior celular incluye entonces un sistema

compuesto por el receptor, el transductor y el efector que finalmente transforma la señal extracelular en sustancias conocidas como segundos mensajeros^{5, 7, 14, 23}.

Otros sistemas efectores involucrados en la señalización de receptores acoplados a proteínas G incluyen: fosfolipasa D, fosfolipasa A₂, y diversos canales iónicos entre los que se encuentran canales de Ca²⁺ dependientes e independientes de voltaje, canales catiónicos no selectivos, canales de Cl⁻ y canales de K⁺, entre otros^{19, 21, 36}.

En este trabajo presentamos una recopilación de la información publicada en diversos artículos de investigación científica, los cuales abordan el tema de las vías que, los receptores adrenérgicos α_1 y β , los receptores muscarínicos y los receptores de dopamina, desencadenan al ser activados por la interacción de agonistas, con el objetivo de actualizar y ampliar la información relacionada a estas vías de señalización, lo cual nos ayuda a comprender el mecanismo de acción de los fármacos que interactúan con este tipo de receptores.

OBJETIVO

REALIZAR UNA INVESTIGACION DOCUMENTAL RELACIONADA CON LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES α_1 - Y β -ADRENERGICOS, MUSCARÍNICOS Y DE DOPAMINA, COMPRENDIDA EN EL PERIODO DE 1990 AL 2001, PARA ACTUALIZAR Y AMPLIAR LOS CONOCIMIENTOS RESPECTO AL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS QUE INTERACTÚAN CON ESTOS TIPOS DE RECEPTORES.

I. GENERALIDADES

1. Mecanismos de acción de los fármacos

Los fármacos modifican los procesos fisicoquímicos característicos de la vida celular, en la mayoría de los casos lo hacen por virtud de su interacción con moléculas funcionales o sistemas macromoleculares, los cuales están presentes en las células que son blanco de la acción medicamentosa. Estas macromoléculas pueden ser agrupadas en cuatro clases^{1,2,3}.

Receptores
Enzimas
Sistemas de transporte
Componentes macromoleculares del aparato genético

Tabla 1.1 Macromoléculas con las que interactúan los fármacos.

Muchos fármacos no producen sus efectos característicos por interacción específica con macromoléculas, más bien lo hacen a través de sus propiedades fisicoquímicas. Los fármacos que actúan de esta manera se agrupan como se muestra en la tabla siguiente:

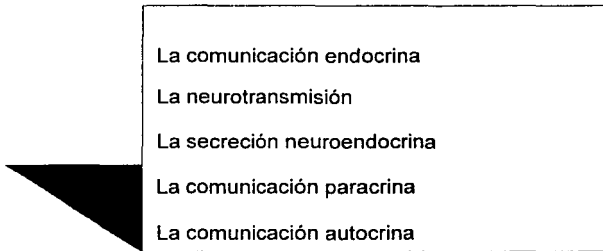
Los que actúan por sus propiedades osmóticas
Agentes oxidantes o reductores
Precipitantes de proteínas
Creadores de barreras físicas
Absorbentes
Surfactantes
Radionúclidos y radiopacos
Anestésicos generales

Tabla 1.2 Clasificación de fármacos que actúan por sus propiedades fisicoquímicas⁴.

Para comprender ampliamente las acciones de un fármaco es útil considerar los efectos producidos sobre el sistema biológico a diversos niveles de complejidad de organización, dentro de los que se encuentran el nivel molecular, estructuras subcelulares, células, tejidos y órganos, organismo intacto e interacción entre organismos. El conocimiento de aspectos como estructura, función, distribución y vías de señalización de los receptores con los que los fármacos interactúan, ha permitido el conocimiento del mecanismo de acción de dichos fármacos a nivel molecular^{2,3,4}.

2. Comunicación celular

Una de las características de los seres vivos es su capacidad de ajustarse a las condiciones que les presenta el medio; a esta característica se le llama plasticidad. La comunicación celular en el organismo se realiza y se coordina principalmente por medio de dos sistemas: el sistema nervioso y el sistema hormonal o endocrino, los cuales operan básicamente por medio de mensajeros químicos. Ambos sistemas permiten presenciar los cambios en el medio externo y ajustar el medio interno. Las formas de comunicación celular incluyen:



La comunicación endocrina
La neurotransmisión
La secreción neuroendocrina
La comunicación paracrina
La comunicación autocrina

Tabla 2.1 Formas de comunicación celular.

Una misma sustancia puede participar en varias formas de comunicación, por ejemplo la adrenalina que es secretada por la médula de la glándula suprarrenal

actúa mediante la comunicación endocrina pero también es un neurotransmisor que actúa sobre células postsinápticas (neurotransmisión) y controla su propia liberación actuando sobre células presinápticas (comunicación autocrina).

Los mensajeros celulares están constituidos por sustancias químicas que entre otras incluyen:

Hormonas Neurotransmisores Autacoides Factores de crecimiento
--

Tabla 2.2 Mensajeros celulares.

Estos mensajeros establecen interacciones químicas con sus receptores específicos localizados en las células blanco, provocando la estimulación de una serie de cascadas de señalización hasta producir sus efectos característicos. Estos mecanismos de señalización pueden ser alterados por la acción de agonistas sobre los mismos receptores sobre los que actúan las sustancias endógenas.

En el presente trabajo abordamos el estudio de las vías de transducción de señales desencadenadas por la interacción de agonistas con receptores α_1 - y β -adrenérgicos, muscarínicos y de dopamina.

3. Receptores

El concepto receptor fue inicialmente propuesto por Paul Ehrlich (1845-1915), quien en sus estudios inmunológicos propuso que en el protoplasma existían cadenas laterales específicas con estructura química y estérica peculiar, las cuales sólo se podrían combinar con los anticuerpos de forma y composición química adecuadas. En estudios de quimioterapia también notó un alto grado de especificidad entre las sustancias químicas y los microorganismos para provocar efectos antiparasitarios.

Estas observaciones lo llevaron a proponer la existencia de cadenas laterales celulares compuestas por grupos funcionales a las que denominó receptores. El investigador J.N. Langley (1852-1926), por su parte, estudiando los efectos del curare, fármaco que bloquea la transmisión de impulsos de los nervios motores a los músculos esqueléticos, descubrió que cuando se cortaba el nervio motor y se le permitía degenerar, todavía era posible estimular químicamente al músculo aplicando nicotina en la región donde antes terminaba el nervio. El curare bloqueaba esta acción de la nicotina. Sin embargo, durante el bloqueo con curare, ya fuese en músculo inervado o denervado, la estimulación eléctrica directa de las fibras musculares producía una respuesta contráctil. Estas observaciones significaban que la nicotina y el curare actuaban sobre alguna otra sustancia y no en el nervio ni el músculo. Langley llamó sustancia receptora a este hipotético material especializado del músculo ^{1, 3, 4}.

Por métodos farmacológicos y la aplicación de técnicas de clonación molecular se han identificado una gran variedad de receptores (tabla 3.1), los cuales poseen una estructura macromolecular característica y están presentes en la membrana plasmática y en membranas de estructuras subcelulares como retículo endoplásmico y núcleo. Normalmente sirven de unión a sustancias endógenas como neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y autacooides ^{3, 5, 6}.

<i>Receptor</i>	<i>Especies</i>	<i>Receptor</i>	<i>Especies</i>
Adrenérgicos		Dopamina	
α_{1A}	rata	D ₁	humano, rata
α_{1B}	hamster	D ₂	humano, ratón, rata
α_{1D}	bovino	D ₃	rata
$\alpha_{2A}, 2B, 2C, 2D$	humano	D ₄	humano
$\beta_1, \beta_2, \beta_3$	humano	D ₅	humano
Muscarínicos		Muscarínicos	
M ₁ , M ₂	humano	M ₄	ave
M ₃	humano	M ₅	humano y rata

Tabla 3.1 Receptores clonados y expresados. Se presenta sólo algunos de los receptores que han sido clonados de diversas especies de mamíferos ^{7, 8, 9}.

Se ha propuesto una clasificación de los receptores basada principalmente en sus características estructurales (Tabla 3.2)¹⁰.

Clases de receptores	Subclases de receptores
Con actividad de canales iónicos	<p>Canales iónicos abiertos por GABA, glicina, 5-HT, acetilcolina(nicotínicos) y glutamato.</p> <p>Canales catiónicos abiertos por glutamato.</p> <p>Canales catiónicos dependientes de voltaje.</p> <p>Relacionados a canales epiteliales de Na⁺ abiertos por compuestos no peptídicos.</p> <p>Relacionados a canales epiteliales de Na⁺ abiertos por péptidos.</p> <p>Relacionados a canales rectificadores internos de K⁺.</p> <p>Relacionados a transportadores ligados a ATPasa.</p> <p>Relacionados a transportadores de neurotransmisores.</p>
Acoplados a proteínas G	<p>Subclase de rodopsina.</p> <p>Subclase de secretina.</p> <p>Receptor metabotrópico glutamato/GABA_B.</p>
Asociados a enzimas	<p>Con actividad intrínseca tirosina cinasa.</p> <p>Asociados a actividad extrínseca tirosina cinasa.</p> <p>Con actividad serina/treonina cinasa.</p> <p>Con actividad extrínseca ciclasa.</p>
Reguladores transcripcionales	<p>No esteroides</p> <p>Esteroides</p>

Tabla 3.2 Clasificación de los receptores. Se presentan las cuatro grandes clases de receptores, dentro de las cuales se encuentran los receptores acoplados a proteínas G.

Los receptores, directamente o a través de moléculas mediadoras, transmiten señales a los efectores celulares, integran información extracelular coordinando señales de múltiples ligandos y amplifican señales bioquímicas a través de mecanismos catalíticos. Desencadenan diversas respuestas funcionales tales como modificación de movimientos iónicos, cambios en la actividad de enzimas y modificación en la producción y/o la estructura de proteínas. Juegan un importante papel en respuestas biológicas como la fototransducción, el olfato, el gusto, la función cardiovascular, la neurotransmisión y las respuestas hormonales. La activación del receptor por la unión del agonista inicia una cascada de transducción de señales, que conduce a diversas respuestas fisiológicas pero también desencadena la activación de mecanismos moleculares que inducen la desensibilización y endocitosis del receptor. El receptor posee cierta movilidad en el plano de la membrana, lo que es importante para su función no sólo en términos de su biosíntesis e integración a la membrana sino también en los procesos de señalización ^{3, 6, 11, 12}. Esta movilidad incluye varias etapas entre las que se encuentran:

- ◆ Un proceso de microagrupación de los receptores activados por el ligando
Agregación del grupo de receptores a sitios de internalización
- ◆ Internalización del grupo de receptores
- ◆ Procesos de fusión lisosomal
- ◆ Transferencia membranal o reciclamiento después de la internalización

Una vez que el receptor ha sido activado por el ligando se lleva a cabo la transducción de la señal, la formación de segundos mensajeros y la propagación intracelular de la señal. Debido a que el ligando o mensajero no penetra a las células, debe generarse una señal en el interior de ésta, a la que se denomina segundo mensajero. Al proceso que se lleva a cabo desde la activación del receptor hasta la formación del segundo mensajero se le llama transducción, porque es la transformación de una señal en otra. Para la propagación y amplificación de la señal en el interior celular, el segundo mensajero activa sistemas efectores intracelulares.

Uno de los esquemas generales que se aplican para explicar la generación de efectos a través de la transducción de señales incluye la señal extracelular que activa al receptor, el sistema transductor, representado por las proteínas G, al que se acopla el receptor activado, el sistema efector, como adenililciclasa, activado por el transductor, y la generación de segundos mensajeros, como AMPc, por actividad catalítica del efector.

Los receptores que se acoplan a proteínas G (figura 3.1) están formados por una sola cadena polipeptídica con una porción NH_2 terminal extracelular, la cual contiene varios sitios de glicosilación; siete dominios transmembranales, los cuales están compuestos, principalmente por residuos de aminoácidos hidrofóbicos dispuestos en α -hélices; tres bucles hidrofílicos extracelulares y tres intracelulares; y una porción COOH terminal dispuesta intracelularmente, la cual contiene sitios de fosforilación caracterizados principalmente por residuos de serina y treonina. En la mayoría de este grupo de receptores, los bucles 2 y 3 y la porción COOH terminal tienen una importante participación en la activación de proteínas G. Los siete dominios transmembranales están dispuestos formando una estructura semejante a un anillo. El sitio de unión al ligando está formado por residuos de aminoácidos contenidos en las α -hélices hidrofóbicas 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23.

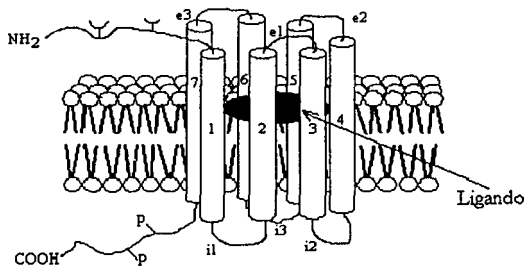


Figura 3.1 Modelo de receptor acoplado a proteína G. Las α -hélices hidrofóbicas transmembranales están representadas con los números 1-7, los sitios de glicosilación por la figura en forma de Y. Los bucles intra y extracelulares se identifican como i1, i2, i3, y e1, e2, e3, respectivamente.

El receptor unido al ligando se modifica configuracionalmente, fenómeno que permite su acoplamiento a la proteína G, la cual se activa y se acopla al sistema efector. Un tipo de receptor puede acoplarse a varias proteínas G, varios tipos de receptores pueden acoplarse a un tipo de proteína G. Una clase de proteína G puede acoplarse a varios sistemas efectores, como también varias clases de proteínas G pueden acoplarse a un mismo sistema efector. Esta diversidad en la convergencia y divergencia de la interacción entre los receptores y las proteínas G y de éstas con los sistemas efectores, produce una gran variedad de vías de señalización desencadenadas por la unión del ligando al receptor. Las proteínas G desempeñan entonces un papel importante en la transducción de señales ²⁴.

4. Proteínas G

Son proteínas compuestas por subunidades α , β y γ de aproximadamente 45-52, 35-37 y 8-10 kDa, respectivamente, pertenecen a la superfamilia de GTPasas, desempeñan un papel regulatorio en la transducción de señales en diferentes tipos de células, ligando GDP y sustituyéndolo por GTP cuando se activan. Se conocen varios subtipos de subunidades α , β y γ . Estas proteínas han sido localizadas en células de corazón, riñón, hígado, músculo esquelético, retina, placenta, entre otros tejidos de especies como rata, ratón, bovino, rana, ave, cobayo, perro y humano. En estado inactivo la subunidad α liga GDP, mientras que en estado activo esta subunidad liga GTP y se separa del dímero $\beta\gamma$, el cual sólo puede disociarse por desnaturalización. La clasificación de las proteínas G (tabla 4.1) se basa en las estructuras y funciones de las subunidades α , las cuales desempeñan un papel fundamental en el funcionamiento de estas proteínas ^{21, 24, 25, 26}.

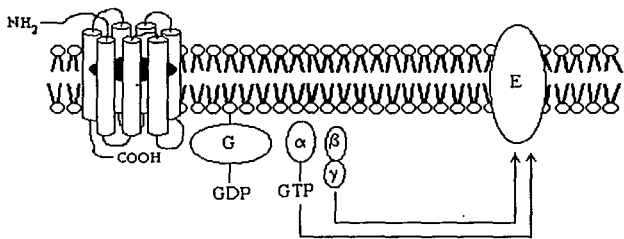
Familia	Subtipo	Familia	Subtipo
G_{sα}	αs	G_{α12}	α12
	αolf		α13
G_{iα}	αi1	G_{qα}	αq
	αi2		α11
	αi3		α14
	αo		α15
	ατ1		α16
	ατ2		
	αz		

Tabla 4.1 Clasificación de proteínas G. Se presentan las distintas familias de este tipo de proteínas clasificadas en función de sus subunidades α

Estas proteínas se acoplan al receptor activado a través de la subunidad α o el dímero $\beta\gamma$. Cuando se produce este acoplamiento, α ligada a GDP, en presencia de Mg^{2+} responde con un cambio conformacional que disminuye su afinidad por este nucleótido, el cual sale del sitio activo y es reemplazado por GTP, que se encuentra en mayor concentración en la célula. La subunidad α ligada a GTP adquiere su conformación activa y se disocia tanto del receptor como del dímero $\beta\gamma$. Originalmente se aceptaba que sólo α activada se acoplaba a sistemas efectores. Sin embargo, se ha encontrado que el complejo $\beta\gamma$ también participa en la transducción de señales en diversas células, activando diversos efectores entre los que se incluyen: adenililciclasa, fosfolipasa C- β 1 y β 2, un canal rectificador interno de K^+ , una fosfolipasa A_2 retinal y fosfoinosítido-3 cinasa. La estimulación de receptores muscarínicos M_1 y M_2 activan vías mitogénicas a través del acoplamiento del dímero $\beta\gamma$ ^{21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32}.

El regreso a la forma inactiva de la proteína G es promovida por la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α , GTP es hidrolizado a GDP y la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ se acoplan nuevamente y retornan al receptor ^{25, 26}.

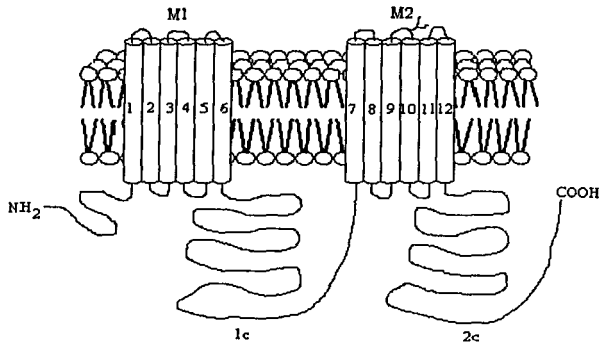
La interacción ligando-receptor se lleva a cabo a través de varios tipos de enlaces químicos como puentes de hidrógeno, enlace iónico, enlace dipolo-dipolo, enlace covalente, y fuerzas de Van der Waals. En el siguiente esquema se representa una forma general de transducción de señales por un receptor acoplado a proteína G



Esquema 3.1 Transducción de señales por el receptor acoplado a proteína G. El agonista activa al receptor, el cual se acopla a la proteína G ligada a GDP. Este acoplamiento promueve el intercambio de GDP por GTP; la subunidad α ligada a GTP se disocia del dímero βγ y ambos se acoplan al sistema efector (E). Por actividad de GTPasa intrínseca de la subunidad α, GTP es hidrolizado a GDP y la proteína G retorna a su estado inactivo.

Los sistemas efectores ampliamente involucrados en las vías de señalización de los receptores acoplados a proteínas G incluyen:

Adenililciclasa. Constituyen una familia de enzimas efectoras que catalizan la biosíntesis de AMPc a partir de ATP. El AMPc es un segundo mensajero que media diversas respuestas celulares principalmente por activación de serina/treonina cinasas. Se han identificado al menos 10 isoformas de adenililciclasas, con masas moleculares de 115 a 150 kDa, las cuales están ligadas a la membrana y contienen regiones citosólicas en las que probablemente se encuentren los sitios catalíticos ²¹.



Esquema 3.2 Estructura de adenililciclase. Se sugiere que está formada por dos regiones identificadas como M1 y M2, las cuales contienen los dominios transmembrana identificados con los números 1-12. Las porciones NH_2 - y COOH -terminal son citoplasmáticas. Las regiones 1c y 2c corresponden a los dos grandes dominios citoplasmáticos en los cuales se piensa que están localizados los aminoácidos responsables de la actividad catalítica ³⁵.

Fosfolipasa C (PLC). Las fosfolipasas más ampliamente involucradas comprenden los tipos PLC- β , PLC- γ y PLC- δ , cada una de las cuales contiene más de un subtipo. Estas fosfolipasas catalizan, de forma dependiente de Ca^{2+} , la hidrólisis de fosfolípidos comunes como fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol 4-monofosfato (PIP) y fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PIP_2)³⁶.

Fosfolipasa A₂ (PLA₂). Enzima que desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios a través de la producción de eicosanoides y factores activadores de plaquetas, es activada por receptores acoplados a proteínas G, provocando hidrólisis de fosfolípidos, para producir ácido araquidónico ³⁷.

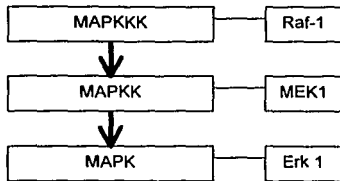
Proteína cinasas (PK). Estas proteínas con actividad de fosfotransferasas en presencia de Mg^{2+} catalizan la transferencia de un grupo γ -fosforil de ATP a residuos

de aminoácidos de proteínas blanco. Se dividen en dos grupos: las que fosforilan residuos de serina y treonina y las que fosforilan residuos de tirosina ²¹.

Dos importantes proteína cinasas que fosforilan residuos de serina y treonina de varias proteínas blanco que incluyen proteínas contráctiles y canales iónicos son PKC y PKA. La PKA es un tetrámero compuesto por dos subunidades regulatorias asociadas a dos subunidades catalíticas. En miocitos cardiacos se encuentra tanto en el citosol como en asociación con la porción intracelular de la membrana ²¹.

La PKC contiene cuatro dominios conservados. Existen varios tipos de PKC, los cuales se clasifican en tres grupos basándose en sus estructuras: el grupo de PKCs convencionales formado por las variantes α , dos variantes β e isozimas γ , las cuales son dependientes de Ca^{2+} ; el grupo de PKCs nuevas formado por las variantes δ , ϵ , η , θ y μ , las cuales no poseen sitio de unión para Ca^{2+} ; y el grupo de PKCs atípicas compuesto por las isozimas π , τ y ξ ²¹.

Vias mitogénicas. Los receptores acoplados a proteínas G también estimulan proteínas activadas por mitógeno, regulando de esta manera procesos de crecimiento, diferenciación, proliferación y muerte celular programada o apoptosis. Una vía que regulan estos receptores incluye proteínas denominadas MAPKs (proteína cinasas activadas por mitógeno), las cuales comprenden una familia de serina/treonina cinasas que una vez activadas, sufren un proceso de translocación al núcleo para fosforilar factores de transcripción involucrados en la síntesis de DNA y división celular. Las MAPK comprenden varias proteínas denominadas Erk1, Erk2, Erk3, Erk5, c-jun NH₂-terminal cinasas (JNK), proteína cinasas activadas por stress (SAPK), p38 MAPK y p57 MAPK. Todas estas proteínas son activadas por MAPKKK (MAP cinasa cinasa cinasa) y MAPKK (MAP cinasa cinasa). Ejemplos de MAPKKK son las proteínas Raf-1 y B-Raf, y de MAPKK son las proteínas MEK1 y MEK2. La cascada que se desencadena para activar proteína cinasas activadas por mitógeno se representa en el siguiente esquema:



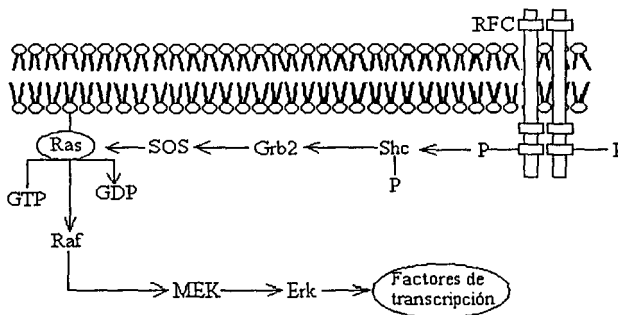
Esquema 3.3 Activación de MAPK. La mitogénesis es activada por muchas vías, una de las cuales incluye a las proteínas denominadas Erk, las cuales activan factores de transcripción, induciendo la expresión genética.

Las proteínas MEK tienen una función dual, pueden activar residuos de serina/treonina y residuos de treonina/tirosina ^{38, 39}.

La vía mitogénica es activada por receptores tirosina cinasa que incluyen receptores de factores de crecimiento epidérmico, neural y derivado de plaquetas. La activación de estos receptores involucra un proceso de dimerización y autofosforilación, los residuos de tirosina fosforilados se acoplan a dominios SH2 (dominios homólogos a la proteína Src) de la proteína Shc, cuyos residuos de aminoácidos fosforilados se acoplan a la proteína Grb2, ésta, a través de dominios SH3, se acopla a otra proteína denominada SOS-1, proteína que cataliza el intercambio de GDP por GTP de la proteína Ras, la cual activa a Raf y desencadena la fosforilación de MAPKK y MAPK. Ras o p21^{ras} es una proteína de bajo peso molecular que se activa por intercambio de GDP por GTP, se diferencia de las proteínas G en que éstas poseen actividad intrínseca de GTPasa, en tanto Ras no posee esta actividad, sino depende de proteínas exógenas como los factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) y proteínas activantes de GTPasa (GAP) ³⁸.

Los receptores acoplados a proteínas que activan vías mitogénicas normalmente se acoplan a las proteínas G_i, G_s, G_{q/11} y G_o, que a través de la subunidad α o el dímero $\beta\gamma$ promueven la actividad de proteínas activadas por mitógeno ³⁸.

Una ruta de señalización normalmente activada por receptores tirosina cinasa y por receptores acoplados a proteínas G es la siguiente:



Esquema 3.4 Vía mitogénica activada por receptores tirosina cinasa. El receptor de factor de crecimiento epidérmico (RFC) al ser activado por el ligando, sufre un proceso de dimerización y autofosforilación de sus residuos de tirosina, los cuales se acoplan a dominios SH2 de la proteína Shc, que es fosforilada y se acopla a dominios SH2 de la proteína Grb2, la cual mediante dominios SH3 se acopla a la proteína SOS que cataliza el intercambio de GDP por GTP de Ras, proteína que se acopla a otra estructura proteica denominada Raf provocando la fosforilación de MEK, que fosforila a las proteínas Erk1 y Erk2³⁸.

Otra ruta mediante la cual distintos tipos de receptores acoplados a proteínas G activan la vía mitogénica es a través de la estimulación de la tirosina cinasa Src, la cual fosforila residuos de tirosina de Shc activando a las proteínas Grb2 y SOS que activa a Ras. La activación de Src puede ser mediada por fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), al cual se acoplan proteínas G activadas por receptor³⁸. Las MAPK activan finalmente factores de transcripción como c-fos, c-jun y CREB (proteína enlazante al elemento de respuesta al AMPc). También PKA y PKC están involucradas en la estimulación de vías mitogénicas⁴⁰.

II. LOS RECEPTORES Y SUS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

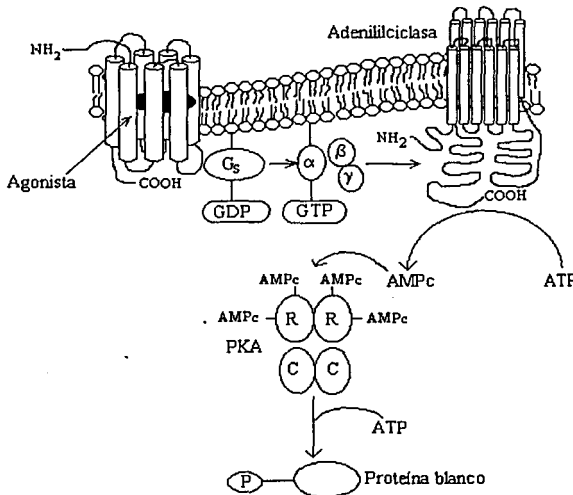
Los receptores α_1 - y β -adrenérgicos, muscarínicos y de dopamina activan diversas vías de transducción de señales, las cuales, generalmente, involucran la activación del receptor por la señal extracelular, la estimulación de proteínas G y la activación de distintos sistemas efectores, los cuales finalmente conducen a la formación de segundos mensajeros. Estos mensajeros intracelulares se acoplan a estructuras proteicas para proseguir con la señalización y de esta manera ampliar la señal que la célula ha recibido a través de receptores específicos.

Dos vías que desencadenan estas cuatro familias de receptores incluyen: la de adenililciclase y la del fosfatidilinositol. Ambas son estimuladas por proteínas G acopladas a los receptores activados por la unión del ligando.

1. Vía de adenililciclase

La activación de la vía de adenililciclase ocurre a través de la proteína G_s en diversas células. Esta vía de señalización es estimulada mediante la interacción ligando-receptor, lo cual provoca modificaciones conformacionales en porciones citoplasmáticas del receptor, principalmente a nivel del tercer bucle intracelular y la región COOH-terminal. El receptor activado se acopla a la proteína G, interacción que puede ocurrir tanto con la subunidad α o el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G_s . En presencia de Mg^{2+} , la subunidad α de la proteína G disminuye su afinidad por el nucleótido GDP, el cual se encuentra originalmente unido a esta subunidad, para intercambiarlo por GTP, nucleótido presente en el citoplasma en mayor concentración, este intercambio induce modificaciones conformacionales en la proteína G provocando que la subunidad α se separe del dímero $\beta\gamma$ y del receptor activado, para acoplarse a la adenililciclase. Esta enzima contiene dos grandes regiones citoplasmáticas, en las cuales se sugiere que se encuentra el dominio catalítico responsable de la biosíntesis de AMPc a partir de ATP. La activación de adenililciclase eleva entonces los niveles de AMPc intracelular, el cual constituye

el segundo mensajero. El AMPc se fija a las subunidades regulatorias de la proteína cinasa denominada PKA, lo que provoca la liberación de las subunidades catalíticas de esta enzima, induciendo de esta manera su actividad fosforilante. La PKA promueve la transferencia de grupos γ -fosforil presentes en la molécula de ATP a residuos de aminoácidos, principalmente de serina y treonina, de proteínas blanco (esquema 1.1). Las proteínas activadas por fosforilación, por acción de PKA, incluyen: diversos canales iónicos, proteínas contráctiles, tirosina cinasas y factores de crecimiento, entre otras.



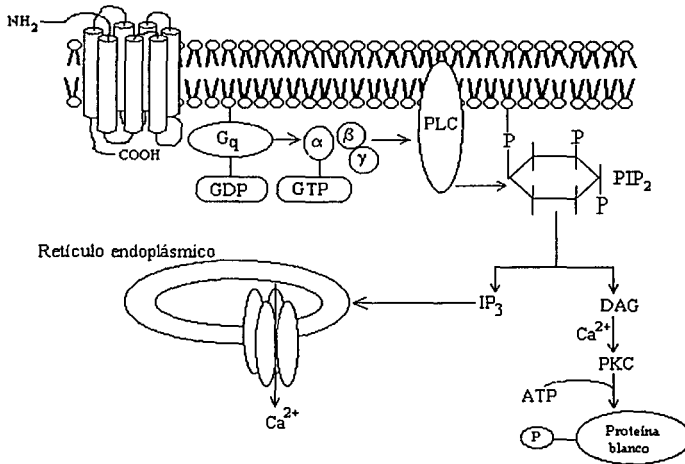
Esquema 1.1 Vía de adenililciclase. El AMPc intracelular se une a las subunidades regulatorias (R) de PKA, lo que induce la separación de las subunidades catalíticas (C) de esta enzima, las cuales transfieren grupos fosfato a residuos de serina y treonina de proteínas blanco.

La regulación de la biosíntesis de AMPc se lleva a cabo por la acción de una fosfodiesterasa específica de este nucleótido, que lo convierte de 3', 5'-AMPc a 5'-AMP, nucleótido que no tiene actividad sobre PKA. Las isozimas V y VI de AC también son inhibidas por los iones Ca^{2+} , en tanto la isozima VIII de esta enzima es estimulada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina.

2. Vía del fosfatidilinositol

La hidrólisis del fosfatidilinositol por acción de PLC, también es estimulada por la activación de los receptores α_1 - y β -adrenérgicos, muscarínicos y de dopamina, los cuales, principalmente mediante la familia de proteínas $G_{q/11}$, promueven la activación de PLC, la cual cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) produciendo los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El mensajero intracelular IP_3 provoca la liberación de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico liso, interactuando con receptores que también funcionan como canales iónicos. El DAG, junto con los iones Ca^{2+} liberados intracelularmente, activan a la proteína cinasa identificada como PKC, la cual es translocada a la porción citoplasmática de la membrana celular donde es completamente activada (esquema 2.1). Esta enzima promueve la fosforilación de proteínas blanco tales como: canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , proteínas contráctiles y proteínas que estimulan vías mitogénicas.

La PKC transfiere grupos γ -fosforil de ATP a residuos de aminoácidos de las proteínas blanco, las cuales al ser fosforiladas sufren cambios conformacionales que constituyen su activación. La fosforilación de proteínas no siempre implica la activación de éstas, en algunos casos algunas proteínas con actividad enzimática son inhibidas por fosforilación.



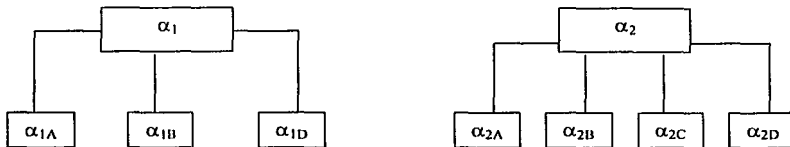
Esquema 2.1 Vía del fosfatidilinositol. La proteína G_q, estimulada por el receptor activado, se acopla a PLC activándola para provocar la hidrólisis de PIP₂ y producir los segundos mensajeros IP₃ y DAG.

3. Receptores adrenérgicos α

3.1 Definición

Los receptores adrenérgicos α son un grupo heterogéneo de receptores que median las acciones centrales y periféricas de las aminas adrenérgicas noradrenalina y adrenalina. Constituyen una subfamilia de receptores con siete dominios transmembranales que se acoplan a proteínas G. Se ha aceptado la existencia de dos grupos denominados α₁ y α₂ (esquema 3.1), el grupo α₁ está formado por los subtipos α_{1A}, α_{1B} y α_{1D} los cuales han sido clonados de diversas especies de mamíferos^{20, 41, 42, 43, 44}. El grupo α₂ está constituido por los subtipos α_{2A}, α_{2B}, α_{2C} y α_{2D}, los cuales también se han clonado de varias especies de mamíferos, incluyendo al humano^{44, 45, 46, 47, 48}. Se han detectado varias isoformas

del subtipo α_{1A} que se conocen como α_{1A-1} , α_{1A-2} , α_{1A-3} y α_{1A-4} , también se ha sugerido la existencia de un cuarto subtipo de α_1 , al cual se denomina α_{1L} ^{20, 49}.



Esquema 3.1 Clasificación de los receptores adrenérgicos α . El gen que originalmente se había propuesto que codificaba para α_{1C} , en realidad codifica para α_{1A} , además, el clon llamado 1A/D se ha presentado como codificador de un nuevo subtipo con propiedades farmacológicas únicas, el α_{1D} ^{19, 20, 54, 55}.

Para la caracterización de estos subtipos de receptores se han empleado técnicas de clonación molecular y estudios de unión con radioligandos. El empleo de agonistas como epinefrina, fenilefrina, p-aminoclidina, norepinefrina, metoxamina y oximetazolina, y antagonistas como prazosina, indormamina, WB4101, SKF104078, fentolamina, corinantina y rauwolsina ha permitido la caracterización del perfil farmacológico de cada subtipo. Distintos agonistas que interactúan con un mismo subtipo de receptor activan, con diferente intensidad, las mismas vías de señalización ^{19, 43, 44, 50, 51}.

Esta familia de receptores ha sido implicada en diversas funciones que incluyen neurotransmisión simpática, inotropía y cronotropía miocárdica, modulación del metabolismo hepático, contracción uterina, regulación de agua y metabolismo electrolítico, modulación del tono vascular y contracción del músculo liso en el sistema genitourinario ²⁰. También controlan la lipólisis, los niveles plasmáticos de lipoproteínas y la secreción de insulina, modulan la hepatotoxicidad inducida químicamente, así como la liberación de hormonas adenohipofisiales, controlan el crecimiento hepático y regulan la función de la pituitaria ⁵⁰.

Los receptores adrenérgicos α están distribuidos diferencialmente en varios tejidos y órganos de mamíferos que incluyen al humano. Entre los tejidos en que se han localizado incluyen cerebelo, corteza cerebral, hipocampo, pituitaria, tallo cerebral, próstata, conducto deferente, riñón, bazo, hígado, pulmón, corazón, aorta, músculo esquelético, entre otros. Cada subtipo presenta distintos perfiles de distribución tisular, incluso distinta distribución subcelular, por ejemplo α_{1A} se localiza predominantemente en el espacio intracelular y α_{1B} se encuentra principalmente en la superficie celular. La localización y expresión de α_{1A} es regulada por una proteína intracelular denominada gC1q-R^{20, 43, 44, 52, 53}.

Todos los receptores adrenérgicos α presentan cierta homología en su estructura, principalmente a nivel de sus siete regiones transmembranales (figura 3.1). Las principales diferencias estructurales se encuentran en sus dominios hidrofílicos extracelulares e intracelulares. Las porciones citoplasmáticas están involucradas en el reconocimiento de la proteína G después de la activación del receptor^{19, 44}.

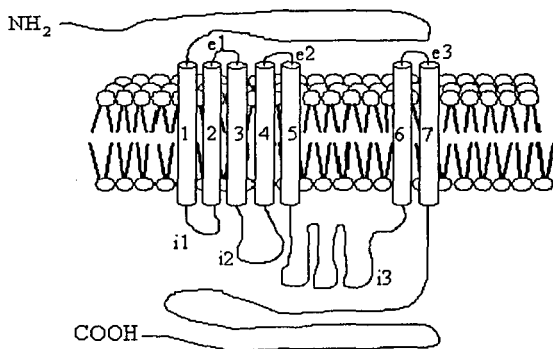


Fig. 3.1 Modelo de receptor α_{1B} de bovino. Las regiones transmembranales 2, 3 y 7, están involucradas en la unión del ligando. El gran bucle i3, la porción COOH-terminal y los dominios transmembranales 5 y 6 son los responsables del acoplamiento del receptor a la proteína G^{19, 20, 43}.

3.2 Vías de señalización

Principalmente los receptores adrenérgicos α_1 están asociados a la hidrólisis de fosfatidilinositol por activación de PLC a través de proteína G, en menor grado producen incremento de los niveles de AMPc por acción sobre adenililciclase a través de la proteína G_s , activan el intercambiador Na^+/H^+ , abren canales de K^+ , potencian corrientes de Ca^{2+} tipo L, promueven la liberación de ácido araquidónico probablemente por activación de PLA_2 y PLD, y están involucrados en la activación de vías mitogénicas ^{19, 20, 43, 50, 56, 57, 58, 59}.

Los receptores α_2 inhiben la acumulación de AMPc a través de las proteínas G_i y/o G_o , en menor grado activan PLC, activan el intercambiador Na^+/H^+ , provocan influjo de Ca^{2+} a través de canales operados por receptor, inhiben otros tipos de canales de Ca^{2+} y activan PLA_2 ^{43, 50, 56, 57, 58}.

3.2.1 Vías de señalización de los receptores adrenérgicos α_1

3.2.1.1 Vía del fosfatidilinositol

Estos receptores activan la hidrólisis de fosfatidilinositol a través de PLC. Esta vía incluye estimulación de varias isoformas de PLC, tales como :PLC- β , PLC- γ y PLC- δ . La PKC finalmente fosforila canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} , así como proteínas contráctiles (esquema 2.1) ^{43, 50, 56, 57, 59}.

Los receptores adrenérgicos α_1 estimulan esta vía, aunque con distintas eficiencias, la tendencia en general en diversas líneas celulares es $\alpha_{1A} > \alpha_{1B} > \alpha_{1D}$ ⁶⁰. Se ha encontrado que estos receptores se acoplan a la subunidad α de la proteína G_q , y a la subunidad α y al dímero $\beta\gamma$ de la proteína G_o para activar PLC y producir contracción del músculo liso de aorta ^{19, 20, 61}. La activación de PLC también puede ser mediada por la subunidad α de G_{11} ; sin embargo, en miocitos de vena porta, G_{uq} activa PLC, en tanto G_{i11} está involucrada en el influjo de Ca^{2+} activando

canales no selectivos permeables a este ión, ambos procesos provocan aumento de Ca^{2+} a nivel intracelular. El receptor α_{1B} se acopla eficientemente a $G_{\alpha14}$ o $G_{\alpha16}$, en tanto el receptor α_{1A} se acopla a $G_{\alpha14}$ pero no a $G_{\alpha16}$. Al parecer, el receptor α_{1D} interactúa pobremente con estas proteínas G. Los receptores α_{1B} y α_{1D} se acoplan a una proteína G_h de elevado peso molecular, la cual activa PLC ^{19, 20, 62}.

Se han involucrado otros inositol polifosfatos con actividad de segundos mensajeros, que incluyen: 1,3,4,5- IP_4 ; 1,3,4,6- IP_4 ; 1,3,4,5,6- IP_5 e IP_6 , los cuales participan en el aumento de la fuerza de contracción del músculo cardiaco y pueden iniciar y mantener el efecto inotrópico positivo, principalmente en corazón de humano y rata. Este efecto es producido por un aumento en la corriente interna de Ca^{2+} y un aumento en la actividad de proteínas contráctiles sensibles a este ión. El segundo mensajero IP_3 provoca liberación de Ca^{2+} intracelular, en tanto IP_4 probablemente produce entrada de Ca^{2+} extracelular. No se conoce el papel de los segundos mensajeros IP_5 e IP_6 en esta vía de señalización, pero están presentes durante el efecto inotrópico positivo después de la activación de receptores adrenérgicos α_1 ⁵⁷. Esta vía también ha sido estudiada en diversas líneas celulares que incluyen PC10, PC4, SK-N-MC y HEK 293, entre otras ^{56, 60}.

Los receptores adrenérgicos α_1 en miocitos de ventrículo de rata potencian corrientes de Ca^{2+} tipo L de forma dependiente de PKC. El aumento de Ca^{2+} intracelular y la activación de PKC activan estos canales. Sin embargo, en células 6-23 de carcinoma de tiroides de rata al parecer los receptores adrenérgicos α_1 se acoplan directamente a este tipo de canales ¹⁹.

3.2.1.2 Vía de adeniliclasa

En menor grado, la activación de receptores adrenérgicos α_1 en células PC10, PC4 y en células de ovario de hamster chino (CHO) estimula adeniliclasa a través de $G_{\alpha s}$, provocando la acumulación de AMPc que activa PKA, dicha

acumulación también es regulada secundariamente por PKC, la cual interactúa con algunas isozimas de adenililciclasa (esquema 1.1) ^{20, 56, 63}.

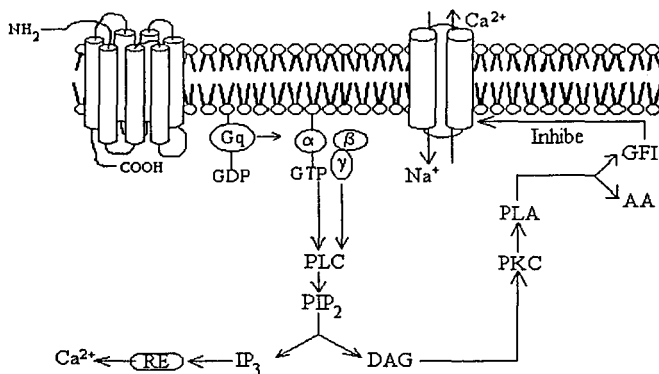
La activación de adenililciclasa ocurre tanto por acción de la subunidad α de la proteína G_s , como del dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G_i y G_o ⁶⁴.

3.2.1.3 Activación de fosfolipasa D y fosfolipasa A₂

Los receptores adrenérgicos α_1 causan liberación de ácido araquidónico en diversas células de mamífero por activación de PLA_2 o de PLD que hidrolizan fosfatidilcolina. En células COS-1, los receptores adrenérgicos α_{1B} y α_{1D} activan la liberación de ácido araquidónico a través de PLA_2 involucrando una proteína G y requiriendo el influjo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje. Sin embargo, en células CHO que carecen de canales sensibles a voltaje estos receptores también provocan la liberación de ácido araquidónico activando PLA_2 . En células de riñón de perro, la activación de PLA_2 es consecuencia de la acción de PKC estimulada por DAG (esquema 3.2). Se ha demostrado que la liberación de ácido araquidónico en este tipo de células es consecuencia de la activación de PLA_2 dependiente de fosforilación por proteína cinasas activadas por mitógeno, subsecuente a la activación de PKC ^{19, 59, 65}.

En corteza cerebral de rata, glándula parótida, aorta, hígado y miocitos cardiacos de mamíferos, los receptores adrenérgicos α_1 estimulan PLD por dos vías, una dependiente de PKC y otra independiente de esta cinasa. A través de la vía del fosfatidilinositol ocurre la activación de PLD por incremento en Ca^{2+} intracelular o activación de PKC. También la PKA estimulada por AMPc puede modular PLD y la liberación de ácido araquidónico. La PLD hidroliza fosfatidilcolina para producir ácido fosfatídico, el cual puede ser convertido a DAG por acción de una DAG hidrolasa. Tanto ácido fosfatídico como DAG activan PKC ^{20, 59, 66, 67}.

En corazón de rata, la estimulación de PLA₂ con actividad lisofosfolipasa promueve la hidrólisis de fosfoinosítido produciendo glicerofosfoinositol 4-fosfato y glicerofosfoinositol 4,5-bisfosfato, los cuales son potentes inhibidores del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en sarcolema cardiaco (esquema 3.2). Esta vía probablemente puede contribuir a los efectos inotrópicos positivos de los receptores adrenérgicos α₁. El mecanismo molecular bajo el cual el glicerofosfoinosítido produce efectos inotrópicos positivos consiste en un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular a través de la inhibición del eflujo de este ión vía el intercambiador Na⁺/Ca²⁺. El glicerofosfoinosítido actúa en sincronía con IP₃ y DAG producidos en la vía del fosfatidilinositol⁶⁸.

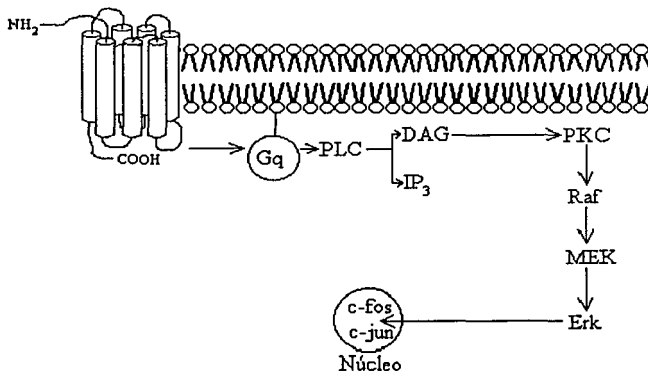


Esquema 3.2 Activación de PLA₂. Esta es una de las probables vías mediante las cuales la estimulación de los los receptores adrenérgicos α₁ provoca la liberación de ácido araquidónico (AA) a través de la activación de PLA₂. Glicerofosfoinositol (GFI) liberado por la acción de PLA₂ sobre fosfoinosítido inhibe al intercambiador Na⁺/Ca²⁺, provocando aumento de la concentración intracelular de Ca²⁺.

3.2.1.4 Vías mitogénicas

Los receptores adrenérgicos α_1 promueven la expresión de los genes c-fos y c-jun a través de la vía Ras/Raf/MAPK en la línea celular de fibroblastos Rat-1, así como en células que de neuroblastoma de rata, adipocitos, hepatocitos, miocitos cardíacos, cultivos de células de músculo liso vascular de aorta de rata, y diversas líneas celulares transfectadas con estos receptores. El aumento de los niveles de estos genes está regulado por varias isozimas de PKC incluyendo PKC α , PKC δ y PKC ϵ . En fibroblastos Rat-1 los receptores adrenérgicos α_1 activan al factor de transcripción CREB por acción de PKA.^{64, 69, 70, 71, 72}

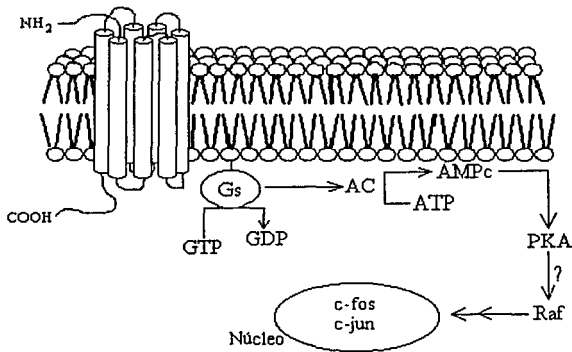
Una vía mediante la cual se activan c-fos y c-jun incluye la acción de PKC, la cual probablemente fosforila a la proteína Raf, que desencadena la activación de Erk1 y Erk2 (esquema 3.3)^{19, 20, 38}.



Esquema 3.3 Vía mitogénica activada por PKC. La PKC fosforila y activa a la proteína Raf, la cual a su vez fosforila a la proteína cinasa cinasa MEK, que fosforila a las proteínas cinasas Erk1 y Erk2, éstas finalmente fosforilan factores de transcripción que provocan la expresión de los genes c-fos y c-jun.

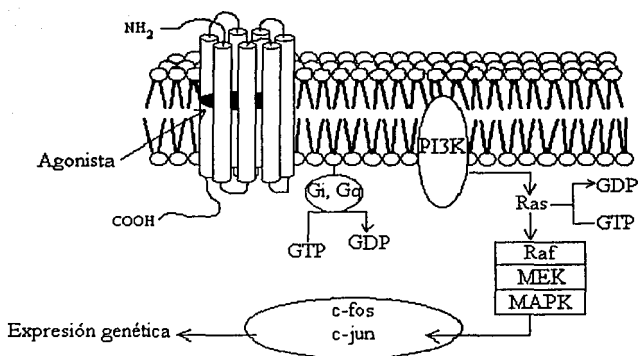
La activación de esta vía puede ser desencadenada por la acción de la subunidad α y del dímero $\beta\gamma$ de proteínas G_q y G_{11} . En células PC12 de feocromocitoma de rata, la vía mitogénica es independiente tanto de Ca^{2+} como de PKC ¹⁹.

Otra vía mediante la cual se activan proteína cinasas activadas por mitógeno incluye la estimulación de adenililciclase por la proteína G_s . Adenililciclase eleva las concentraciones de AMPc, el cual activa PKA que fosforila a proteínas involucradas en la vía mitogénica para activar la expresión de los genes c-fos y c-jun ²⁰. Aún no se define en forma precisa esta vía, pero se proponen los siguientes eventos:



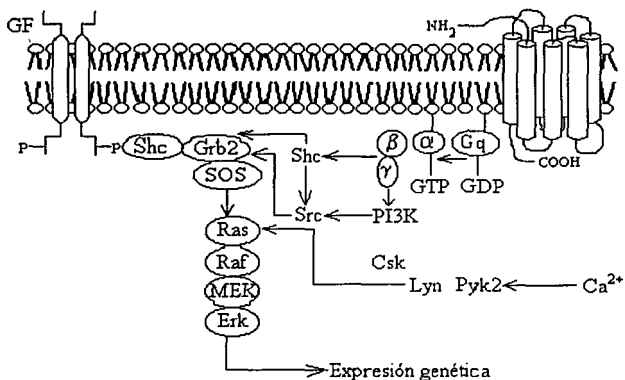
Esquema 3.4 Vía mitogénica activada por PKA. No se conoce la proteína que es fosforilada directamente por PKA, pero probablemente se trate de Raf, la cual desencadena la fosforilación de las proteínas involucradas en la expresión de los genes c-fos y c-jun.

Los receptores adrenérgicos α_{1A} y α_{1B} en células de músculo liso vascular de humano activan la vía mitogénica a través de la activación de la enzima PI3K, la cual probablemente sea activada por la subunidad α de G_i , o bien por el dímero $\beta\gamma$ de G_q (esquema 3.5). Esta enzima activa a la proteína Ras para desencadenar la fosforilación de proteínas activadas por mitógeno ^{20, 73}.



Esquema 3.5 Vía mitogénica activada por PI3K. La activación de la proteína Ras por PI3K provoca la estimulación de la proteína Raf, la cual fosforila y activa a MEK, proteína cinasa que fosforila a las MAPK Erk1 y Erk2.

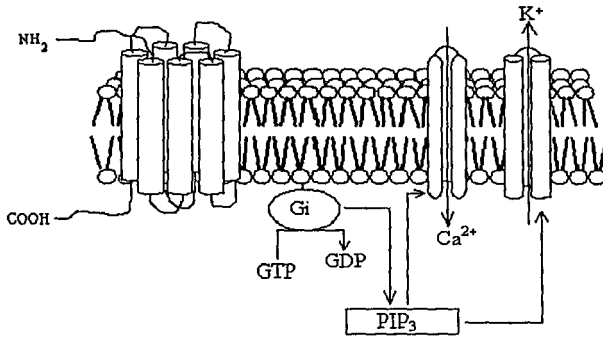
La activación de la vía mitogénica también ocurre en células 293 de riñón embrionario de humano por activación de receptores adrenérgicos α_1 . En estas células participan proteínas como Shc y Grb2 y diversas tirosina cinasas como Pyk2 y Lyn. No se conoce la vía de señalización precisa que involucra a estas estructuras pero se ha propuesto que el dímero $\beta\gamma$ de G_q puede activar a la proteína Shc y ésta acoplarse a Grb2 y a la proteína SOS para desencadenar la vía Ras/Raf/MAPK. La proteína Shc, después de su activación, puede acoplarse a la proteína Src y a través de ésta acoplarse a las proteínas Grb2 y SOS para activar a Ras y la consecuente fosforilación de las proteínas activadas por mitógeno. El dímero $\beta\gamma$ de G_q puede acoplarse a la enzima PI3K que activa a Src y ésta a las proteínas Grb2 y SOS. Se ha encontrado que Ca^{2+} liberado intracelularmente por acción de IP_3 puede activar a la tirosina cinasa Pyk2, la cual está involucrada en la vía mitogénica, aunque no se conocen las proteínas mediadoras para la activación de Erk1 y Erk 2 (esquema 3.6)¹⁹.



Esquema 3.6 Vía mitogénica activada por otras estructuras. Los receptores de factores de crecimiento (GF) desencadenan vías mitogénicas a través de las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc que se acoplan a la proteína SOS activando la vía Ras/Raf/MAPK. Los receptores adrenérgicos α_1 también activan esta vía a través de varias rutas que aun son hipotéticas. Se ha detectado la presencia de las tirosina cinasas PyK2, Lyn y Csk, aunque no se conoce la manera en que están relacionadas para activar la mitogénesis. Los iones Ca^{2+} que activan Pyk2 son liberados del retículo endoplásmico por acción de IP_3 ^{19, 38}.

3.2.1.5 Modulación de canales iónicos

Los receptores adrenérgicos α_1 activan algunos tipos de canales de K^+ y de Ca^{2+} a través de la proteína G_i , cuya subunidad α activa fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), el cual estimula este tipo de canales²⁰.



Esquema 3.7 Apertura de canales iónicos. El fosfatidilinositol PIP_3 activa directamente canales de Ca^{2+} y de K^+ aunque no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual lo hace ⁷⁰.

Muy probablemente los receptores adrenérgicos α_1 producen contracción en músculo liso de aorta y otros vasos sanguíneos de rata, provocando salida de iones Cl^- a través de la activación de canales de Cl^- , originando despolarización de la membrana, fenómeno que abre canales de Ca^{2+} tipos L y T dependientes de voltaje ⁷⁴.

La PKC activada por los receptores adrenérgicos α_1 a través de la vía del fosfatidilinositol abre canales de Ca^{2+} , fenómeno que también ocurre por acción de Ca^{2+} liberado del retículo endoplásmico. Se ha encontrado que el incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} por activación de receptores adrenérgicos α_1 en células C6 puede activar la enzima sintasa de óxido nítrico que cataliza la biosíntesis de óxido nítrico ⁷⁵.

4. Receptores adrenérgicos β

4.1 Definición

Los receptores adrenérgicos β son estructuras proteicas localizadas en la membrana celular, pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (figura 4.1), las cuales activan a un pequeño pero diverso grupo de efectores incluyendo adenililciclase, fosfolipasas y varios canales iónicos. Se conocen los subtipos β_1 , β_2 , β_3 , que ya han sido clonados y un subtipo β_4 que ha sido identificado farmacológicamente^{21, 76, 77}. Los cuatro subtipos se encuentran distribuidos en corazón, colon, esófago, tejido adiposo abdominal, riñón, pulmón e hígado de varias especies de mamíferos incluyendo al humano. Los receptores β_1 y β_2 han sido detectados en tejido adiposo de rata, ratón, hamster, conejo y perro^{76, 77, 78}. También se han encontrado en tráquea, bronquios, bronquiolos, macrófagos, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos de vías aéreas de humano y cobayo⁷⁹. El receptor β_4 ha sido detectado en corazón de ratón, adipocitos y colón de rata⁸⁰.

Los receptores β_1 y β_2 están involucrados en la regulación de la lipólisis, en respuestas inotrópicas y cronotrópicas cardiacas, regulación de la contracción de músculo liso en pulmón, útero y pared vascular periférica y en la regulación de la glucogenólisis en músculo esquelético e hígado⁷⁸. En corazón de humano, el receptor β_1 provoca aumento de la automaticidad, frecuencia, excitabilidad y fuerza de contracción; el receptor β_2 está funcionalmente ligado a respuestas inotrópicas positivas; el receptor β_3 probablemente produce efectos inotrópicos positivos; y el receptor β_4 está involucrado en la producción de efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos^{21, 80}.

Los agonistas ampliamente utilizados para la detección de receptores adrenérgicos β incluyen: noradrenalina, adrenalina, CL 316243, CGP 12177, BRL 37344, isoproterenol, dobutamina, m-proteranol y terbutalina. Entre los

antagonistas se encuentran: CGP20712, ICI 118551, propranolol, metoprolol, atenolol y SR 59230A ⁷⁷.

La unión de adrenalina y noradrenalina al receptor se lleva a cabo a través del establecimiento de puentes de hidrógeno entre los grupos OH de estas catecolaminas y residuos de serina probablemente localizados en los dominios II, III y V de las regiones transmembranales del receptor. El grupo catiónico de las aminas probablemente establece interacciones iónicas con residuos de ácido aspártico, serina y fenilalanina localizados en el tercer dominio hidrofóbico del receptor. En el acoplamiento del receptor a la proteína G muy probablemente están involucrados el tercer bucle citoplasmático, la quinta y sexta regiones transmembranales y la porción COOH terminal (figura 4.1) ^{23, 81}.

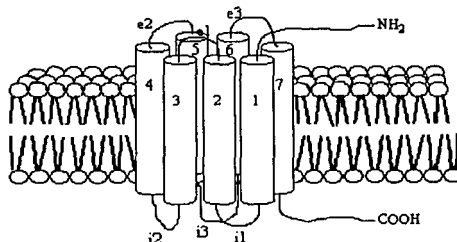


Figura 4.1 Modelo plegado de receptor adrenérgico β . Las α -hélices hidrofóbicas están distribuidas formando un anillo dentro del cual se encuentra el sitio de unión al ligando. Los receptores β_1 y β_2 en sus dominios citoplasmáticos poseen sitios de fosforilación para la acción de PKA o de cinasas de receptores adrenérgicos β , en tanto el receptor β_3 difiere de los otros subtipos en que no posee sitios de fosforilación ^{81, 82}.

4.2 Vías de señalización

Los receptores adrenérgicos β estimulan varias vías de señalización que involucran activación e inhibición de adenililciclasa, estimulación de PLC que

promueve la hidrólisis de fosfatidilinositol, modulación de varios tipos de canales iónicos, modulación del intercambiador Na^+/H^+ y activación de vías mitogénicas.

4.2.1 Vía de adenililciclase

Los cuatro subtipos de receptores adrenérgicos β están ampliamente involucrados en la activación de la enzima adenililciclase a través de la proteína G_s , provocando aumento en el nivel intracelular de AMPc, el cual activa PKA que fosforila proteínas contráctiles, fosfolambano y diversos canales iónicos (esquema 1.1)⁸³.

Es probable que el receptor adrenérgico β_2 se acople tanto a la subunidad α de G_s para activar adenililciclase como de G_i para inhibirla, involucrando diferentes dominios citoplasmáticos del receptor, G_i se acopla a adenililciclase a través de la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ ^{13, 84, 85}. Los receptores β_1 y β_3 de humano transfectados a la línea celular CHW 1102 se acoplan a la proteína G_s que estimula adenililciclase con distintas eficiencias⁸⁶. En miocitos cardiacos de rata neonata, los receptores adrenérgicos β se acoplan a adenililciclase tipo VI a través de la proteína G_s elevando los niveles de AMPc⁸⁷.

La estimulación del receptor β_2 en células de músculo liso vascular conduce a vasodilatación a través del incremento de la concentración intracelular de AMPc. Se ha sugerido que el efecto relajante es potenciado por óxido nítrico ya que la inhibición de la enzima sintasa de óxido nítrico inhibe el efecto relajante de estos receptores⁸⁸.

En corazón de mamífero, los receptores adrenérgicos β activan la vía adenililciclase-AMPc-PKA, la cual fosforila y abre canales de Ca^{2+} tipo L, lo que provoca influjo de iones Ca^{2+} y promueve la amplitud y fuerza de contracción del músculo. Los tipos V y VI de adenililciclase son activadas por estos receptores pero inhibidas por Ca^{2+} . Se ha propuesto que la concentración intracelular elevada de iones Ca^{2+} podría inhibir la síntesis de AMPc por estas isoformas de

adenililciclase y proporcionar así un efecto de retroalimentación negativa. Sin embargo, en ratones transgénicos se ha encontrado que adenililciclase tipo VIII mantiene la síntesis de AMPc debido a que es activada por el complejo Ca^{2+} /calmodulina. Mientras los tipos V y VI de adenililciclase son inhibidos por Ca^{2+} , el tipo VIII es activado por estos iones a través de calmodulina⁸⁹.

En células alveolares tipo II de mamífero, la activación de la vía de adenililciclase activada por receptores adrenérgicos β , junto con la hidrólisis de fosfatidilinositol activada por ATP y el sistema Ca^{2+} /calmodulina regulan la secreción de surfactante pulmonar. En estas células, la secreción de surfactante está relacionada con el aumento intracelular de la concentración de Ca^{2+} que es considerado un importante segundo mensajero en este proceso. La elevación en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} se debe a la liberación de estos iones del retículo endoplásmico por acción de IP_3 y muy probablemente por la apertura de canales de Ca^{2+} tipo L, activada por PKA dependiente de AMPc⁹⁰.

4.2.2 Hidrólisis del fosfatidilinositol

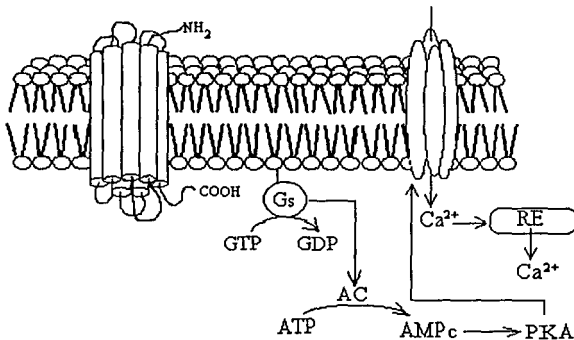
En células de varios tipos de músculo liso, los receptores adrenérgicos β , principalmente el subtipo β_2 , que se acoplan a la proteína G_q , activan PLC que hidroliza fosfatidilinositol produciendo los segundos mensajeros IP_3 y DAG (esquema 2.1)²¹.

4.2.3 Modulación de canales iónicos

4.2.3.1 Canales de Ca^{2+}

La fosforilación del canal de Ca^{2+} tipo L a través de la acción de PKA (esquema 4.1) provoca un aumento en la amplitud de corrientes de Ca^{2+} , lo cual funciona como disparador de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, esto provoca

un incremento transitorio en el nivel intracelular de estos iones dando lugar al proceso excitación-contracción ²¹.



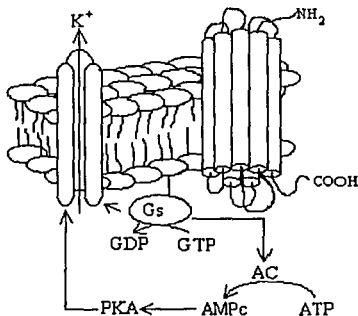
Esquema 4.1 Activación del canal de Ca²⁺ tipo L. La apertura del canal de Ca²⁺ tipo L permite la entrada de iones Ca²⁺, lo cual induce la liberación de iones Ca²⁺ almacenados en el retículo endoplásmico (RE).

Sin embargo, en miocitos ventriculares de corazón de rata el receptor β_2 no provoca movimiento de Ca²⁺ y contracción muscular a través de la activación de adenililciclase y elevación del nivel de AMPc intracelular ⁹¹.

4.2.3.2 Canales de K⁺

En músculo liso de arteria coronaria y otros tipos de músculo liso, la activación de receptores adrenérgicos β provoca relajación muscular a través de fosforilación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (K_{Ca}) por acción de PKA (esquema 4.2). Muy probablemente la apertura de estos canales está involucrada en la hiperpolarización y la consecuente relajación del músculo liso coronario. Sin embargo, en preparaciones de arteria coronaria de cerdo se encontró que la apertura de estos canales es provocada por dos eventos independientes que

incluyen fosforilación del canal por PKA dependiente de AMPc y acción directa de la subunidad α de la proteína G_s (esquema 4.2). Muy probablemente este mecanismo dual de apertura de canales K_{Ca} esté presente en otros tipos de músculo liso. La apertura de estos canales por fosforilación ha sido estudiada también en cerebro, riñón y varios tipos de músculo liso de mamífero ⁹².



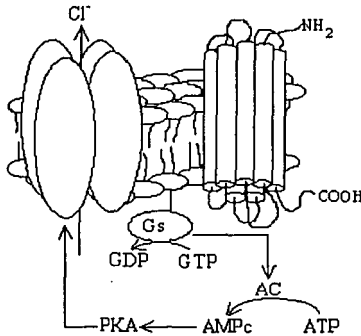
Esquema 4.2 Activación del canal de K_{Ca} . La fosforilación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} por la acción de PKA o por la acción directa de la subunidad α de la proteína G_s provoca la apertura de este canal y la salida de iones K^+ ocasionando disminución del potencial de membrana que conduce a hiperpolarización.

En arteria coronaria de cobayo y en músculo detrusor de rata los receptores adrenérgicos β activan canales de K^+ dependientes de ATP por acción de PKA dependiente de AMPc. Estos canales también pueden ser activados directamente por la subunidad α de G_i ^{93, 94}. La activación de estos canales provoca relajación del músculo liso.

4.2.3.3 Canales de Cl^-

Los receptores adrenérgicos β en miocitos cardiacos, a través de PKA, activan canales de Cl^- independientes de voltaje (esquema 4.3). Esta vía contribuye a la

regulación de la duración del potencial de acción y al potencial restante de membrana de estas células. Probablemente PKA también fosforile y active canales rectificadores internos de K^+ y provoque la inhibición de canales de Na^+ ⁹⁵.

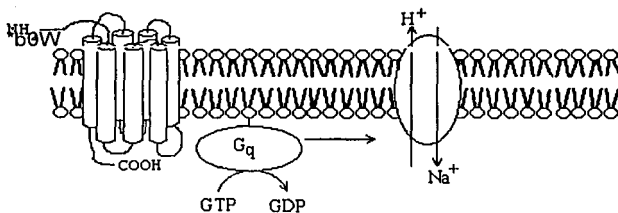


Esquema 4.3 Activación de canales de Cl^- . La fosforilación de canales de Cl^- , mediante la acción de PKA permite su apertura y la salida de iones Cl^- al espacio extracelular.

En astrocitos, la activación de receptores adrenérgicos activa el sistema de AMPc y la cascada de inositol fosfato. Los receptores adrenérgicos β activan canales K_{Ca} de alta conductancia induciendo la hiperpolarización de la membrana ⁹⁶.

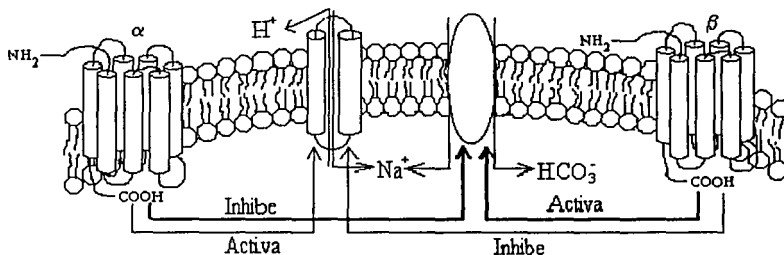
4.2.3.4 Intercambiador Na^+/H^+

La activación del intercambiador Na^+/H^+ provoca la salida de H^+ del citoplasma y la entrada de iones Na^+ provocando un aumento del pH intracelular. En células de mucosa de ileon de perro, en las líneas celulares L y L1, así como en cultivos primarios de células mesangiales de rata y en líneas celulares de osteosarcoma de rata y astrocitoma de humano, los receptores adrenérgicos β activan el intercambiador Na^+/H^+ a través de la proteína G_q (esquema 4.4). La estimulación de este intercambiador provoca alcalinización del medio intracelular ⁹⁷.



Esquema 4.4 Activación del intercambiador Na⁺/H⁺. Probablemente se lleve a cabo a través de la proteína G_q que es activada por el receptor β₂ estimulado por la unión del ligando ⁹⁷.

Sin embargo, en miocitos ventriculares de cobayo, la estimulación de receptores α₁ inhibe al transportador Na⁺/HCO₃⁻ y simultáneamente estimula al intercambiador Na⁺/H⁺, en tanto la estimulación de receptores adrenérgicos β produce efectos opuestos (esquema 4.5) ⁹⁸.



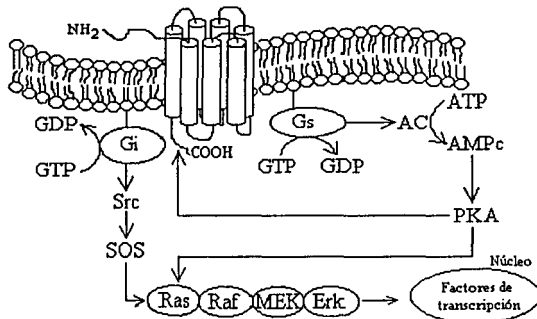
Esquema 4.5 Modulación del intercambiador Na⁺/H⁺ y del transportador Na⁺/HCO₃⁻. Los receptores adrenérgicos β inhiben al intercambiador Na⁺/H⁺, en tanto activan al transportador Na⁺/HCO₃⁻. En este tipo de células predomina la acción de los receptores adrenérgicos α₁.

En varias líneas celulares la estimulación del receptor adrenérgico β_2 activa al intercambiador Na^+/H^+ a través de proteína G y lo inhibe a través del factor regulador del intercambiador Na^+/H^+ tipo III (NHERF-III) como resultado de la unión de este factor a residuos de la porción COOH-terminal citoplasmática del receptor activado por agonista ^{21,99}.

El receptor adrenérgico β_2 induce un efecto inotrópico positivo en miocitos ventriculares de rata a través de un mecanismo independiente de AMPc que involucra alcalinización intracelular, debido a la activación de un mecanismo regulatorio del pH intracelular dependiente de HCO_3^- . Probablemente este receptor provoca amplitud en la contracción cardíaca a través del acoplamiento al transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Este mecanismo también ha sido observado en miocitos de cobayo y de rata neonata ¹⁰⁰.

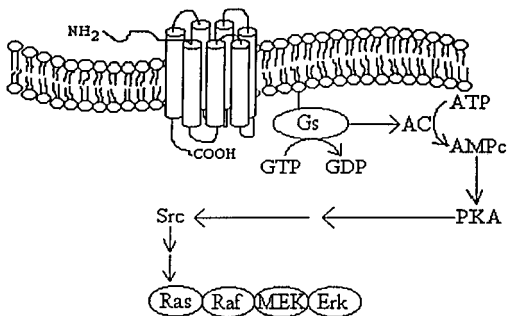
4.2.4. Vías mitogénicas

Los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 activan la cascada Ras/Raf/MAPK a través de PKA estimulada por AMPc. La enzima PKA fosforila y activa a la proteína Ras que desencadena la activación de las proteínas Raf/MAPKK/MAPK, induciendo la expresión génica (esquema 4.6). Los residuos de serina y treonina del receptor β_2 son fosforilados por la acción de PKA, esto ocasiona modificaciones conformacionales del receptor que provocan su acoplamiento a la proteína G_i , la cual mediante el dímero $\beta\gamma$ estimula la vía mitogénica a través de la activación de las proteínas Src y SOS (esquema 4.6) ²¹.



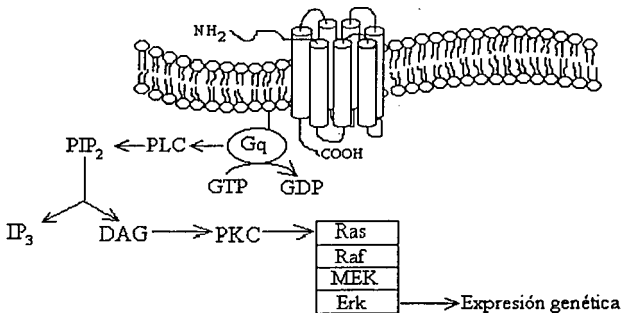
Esquema 4.6 Vía mitogénica activada por PKA y por G_i. La PKA fosforila a Ras y ésta activa a la proteína MEK, la cual estimula Erk que finalmente activa factores de transcripción. La PKA también fosforila residuos de serina y treonina del receptor lo que induce su acoplamiento a la proteína G_i, cuyo dímero βγ activa a la tirosina cinasa Src, que a su vez activa a Sos, la cual fosforila a Ras y desencadena la activación de la vía mitogénica²¹.

En adipocitos de ratón, el receptor adrenérgico β₃ activa la mitogénesis por acción de PKA que activa a la tirosina cinasa Src, ésta probablemente desencadena la activación de las proteínas Shc, Grb2 y SOS para estimular a Ras y conducir a la fosforilación de las proteínas Erk1 y Erk2, las cuales activan genes de expresión inmediata (esquema 4.7)¹⁰¹.



Esquema 4.7 Vía mitogénica activada por PKA a través de Src. Probablemente existan otras estructuras involucradas en la activación de Src por PKA y en la activación de Ras.

El receptor adrenérgico β_2 también activa la vía mitogénica a través de la acción de PKC estimulada por la vía del fosfatidilinositol (esquema 4.8). Probablemente AMPc también estimule directamente PKC, así como DAG puede activar PKA²¹.



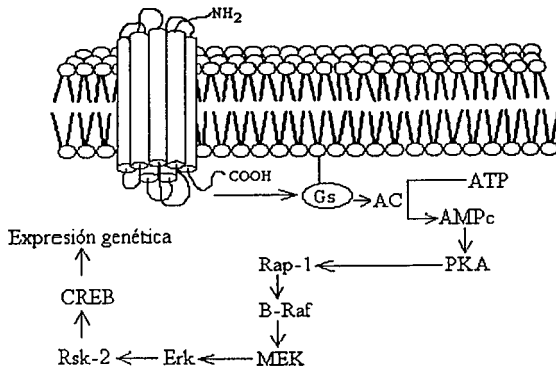
Esquema 4.8 Activación de la vía mitogénica por PKC. Se sugiere que PKC fosforila a la proteína Ras, ésta fosforila y activa a Raf que a su vez desencadena la activación de las proteínas MAPKK y MAPK²¹.

En adipocitos y células CHO, la estimulación de β_3 activa específicamente a las proteínas Erk1 y Erk2, a través de las proteínas G_i , G_o y G_s , involucrando PI3K y independientemente de AMPc. En estas células ocurre de manera simultánea la activación de la vía mitogénica y la activación de adenililciclase para elevar los niveles de AMPc por acción de β_3 sobre la proteína G_s ^{102, 103}.

En timocitos de mamífero, los receptores adrenérgicos β activan la muerte celular programada o apoptosis estimulando la vía mitogénica de forma independiente de PKA, involucrando la activación de Lck que pertenece a la familia Src de tirosina cinasas, a través de la subunidad α de la proteína G_s ¹⁰⁴.

En miocitos de corazón de rata, la estimulación crónica del receptor β_1 ocasiona muerte celular por apoptosis en tanto el receptor β_2 tiene efectos opuestos, previniendo la fragmentación nuclear y las modificaciones morfológicas celulares causadas por apoptosis a través de una vía de señalización que involucra el acoplamiento del receptor a la proteína G_i y la activación probablemente a través de ésta, de PI3K, la cual fosforila a la serina/treonina cinasa Akt/PKB, sin involucrar la vía MAPK. Esta vía se activa en cardiomiocitos expuestos a hipoxia o a la aplicación de peróxido de hidrógeno ¹⁰⁵.

Otra vía mitogénica activada por receptores adrenérgicos β que involucra MAPK, observada en hipocampo de rata, incluye la acción de PKA sobre una proteína denominada Rap 1, la cual fosforila y activa a la proteína B-Raf, que a su vez activa a MEK y ésta a MAPK, la cual probablemente a través de otra proteína denominada RSK2 activa al factor de transcripción CREB que induce la expresión genética (esquema 4.9) ⁴⁰.



Esquema 4.9 Vía mitogénica en hipocampo de rata. La PKA fosforila a la proteína Rap1, la cual activa a B-Raf, que a su vez activa a MEK y ésta a MAPK, que a través de Rsk estimula al factor de transcripción CREB.

5. Receptores muscarínicos

5.1 Definición

Los receptores muscarínicos son glicoproteínas consideradas receptores de superficie celular con los que acetilcolina interactúa provocando modificaciones conformacionales, lo que promueve su acoplamiento a través de proteínas G a otras estructuras celulares tales como enzimas y canales iónicos. Por clonación molecular se han identificado los subtipos m1, m2, m3, m4 y m5, que como los demás receptores acoplados a proteínas G están formados por una sola cadena polipeptídica con siete dominios hidrofóbicos transmembranales, tres bucles hidrofílicos extracelulares y tres intracelulares. Los dominios transmembranales están ensamblados en una estructura empaquetada parecida a un anillo. La porción NH₂ terminal es extracelular y contiene sitios de glicosilación, mientras que la porción COOH terminal ubicada en el espacio intracelular posee residuos de cisteína que pueden ser palmitolados, lo cual no es determinante para la interacción ligando receptor. El bucle i3 es el principal responsable del acoplamiento del receptor activado a la proteína G, y además es determinante en la diferenciación de los subtipos (figuras 5.1 y 5.2) ^{15, 18, 106, 107, 108}.

En tracto respiratorio y gastrointestinal, la activación de receptores muscarínicos por acetilcolina produce contracción, mientras que en otros tejidos como los vasos sanguíneos del pene, conductos deferentes proximales y vejiga urinaria provoca relajación. Los agonistas muscarínicos regulan el diámetro pupilar vía activación de receptores pre y postsinápticos. Aunque el principal efecto de agonistas muscarínicos en el iris es la contracción, se ha demostrado que un componente de la respuesta muscarínica involucra la formación de prostanoïdes que inhiben parcialmente la respuesta contráctil. En células de músculo liso de vías aéreas, originan contracción y en células de glándula submucosa provocan secreción de moco. Son excitatorios en estómago de conejo, rata, cobayo y humano ^{18, 108, 109, 110}.

Esta familia de receptores está ampliamente distribuida en diversos tipos de músculo liso de especies de mamíferos que incluyen rata, ratón, cerdo y humano, entre otros. Se han detectado en diferentes proporciones en diversas zonas del tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, vías urinarias y aparato reproductor ¹⁰⁸. También han sido localizados en corazón, corteza cerebral, hipocampo y cuerpo estriado de rata, en neuronas periféricas de mamíferos, y en algunas especies están presentes en nervios adrenérgicos postganglionicos ^{27, 111, 112, 113, 114, 115, 116}.

Se han localizado receptores muscarínicos en terminales del sistema nervioso central que median la liberación de neurotransmisores. Por su localización anatómica a estos receptores se les denomina receptores presinápticos y de acuerdo a su localización neuronal se dividen en autorreceptores y heterorreceptores. Sobre los autorreceptores, acetilcolina actúa para regular su liberación, que por lo general se lleva a cabo a través de un mecanismo autoinhibitorio, en tanto la activación de los heterorreceptores por acetilcolina regula la liberación de otros neurotransmisores, como la potenciación de la liberación de dopamina en terminales nerviosas dopaminérgicas de cuerpo estriado de cerebro de rata e inhibición de la liberación de glutamato y ácido aspártico en hipocampo de rata. Se han detectado receptores muscarínicos autoinhibitorios presinápticos en vías aéreas de cobayo, humano y diversas especies. Probablemente se trata del receptor M₂. También se sugiere la existencia de receptores muscarínicos presinápticos facilitatorios e inhibitorios, los cuales modulan la liberación de acetilcolina ^{108, 109, 110, 117, 118, 119}.

Los antagonistas empleados en la identificación de los receptores muscarínicos incluyen: atropina, pirenzepina, metoctramina, 4-DAMP, p-F-HHSiD, himbacina, darifenacina, tripitramina, AF-DX116, zamifenacina, guanilpirenzepina, PD 102807, MT3 y MT7. Entre los agonistas se encuentran McN-A-343 y LY 2977802 ^{18, 108}.

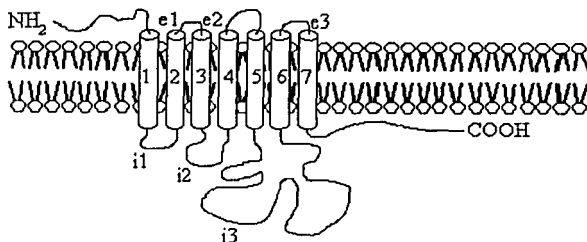


Figura 5.1 Modelo desplegado de receptor muscarínico. El gran tercer bucle intracelular (i3) es el principal responsable de la interacción del receptor activado a la proteína G y el que establece la diferencia entre los subtipos de receptores muscarínicos, también contiene sitios de fosforilación involucrados en la desensibilización del receptor ^{15, 107}.

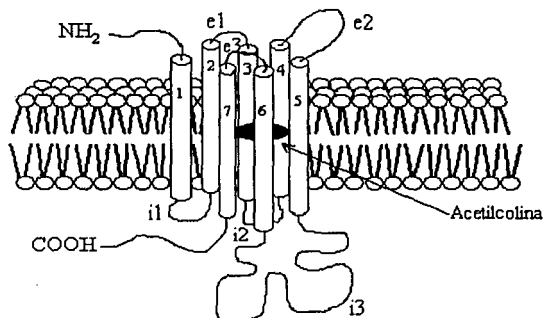


Figura 5.2 Arreglo de los dominios transmembranales del receptor muscarínico. Los números 1-7 representan las regiones transmembranales. Los dominios 3, 5, 6 y 7 son los que están involucrados en la interacción de acetilcolina con el receptor. Los aminoácidos con los que principalmente interacciona acetilcolina son tirosina, ácido aspártico y treonina ¹²⁰.

5.2 Vías de señalización

La activación de los receptores muscarínicos estimula diversas vías de señalización que involucran varios sistemas efectores entre los que se encuentran: adenilciclasa,

PLC, PLD, PLA₂, canales de Ca²⁺, canales de K⁺, Cl⁻ y Na⁺ dependientes de Ca²⁺ y proteína cinasas activadas por mitógeno ^{106, 108, 121, 122}.

5.2.1 Vías de adenililciclasa y fosfatidilinositol

Generalmente los receptores muscarínicos M₁, M₃ y M₅ se acoplan a la familia de proteínas G_q, cuya subunidad α estimula PLC- β y PLC- γ , enzimas que provocan hidrólisis de fosfatidilinositol produciendo IP₃ y DAG. En tanto los receptores muscarínicos M₂ y M₄ se acoplan a las proteínas G_i, G_o y posiblemente G_z, las cuales mediante la subunidad α inhiben adenililciclasa y evitan la acumulación de AMPc. Sin embargo, el receptor M₄, en bulbo olfatorio de rata se acopla a la proteína G_s para estimular adenililciclasa, el receptor M₅ en células A2058 inhibe la producción de AMPc pero no estimula la producción de IP₃. Los receptores M₁, M₃ y M₅ aumentan niveles de AMPc en células A9L, probablemente por un mecanismo indirecto a través de Ca²⁺ o a través de la activación de las isozimas II y IV de adenililciclasa por el complejo $\beta\gamma$ de proteínas G. En células de neuroblastoma y de bulbo olfatorio de rata, células acinares de parótida de ratón, glándula adrenal de rata y una línea celular de neuroblastoma humano, el receptor M₃ media la acumulación de AMPc. El receptor M₁ expresado en células CHO activa adenililciclasa por un mecanismo dependiente de IP₃ y Ca²⁺. La regulación de la producción de AMPc puede ocurrir a través de los tipos I, II, III, IV y V de adenililciclasa. En astrocitos y células de tiroides, la acumulación de AMPc también, puede ocurrir por un mecanismo alterno que involucra inhibición de fosfodiesterasas mediada por receptor ^{18, 106, 107, 108, 110, 119, 121}. (Ver esquemas 1.1 y 2.1)

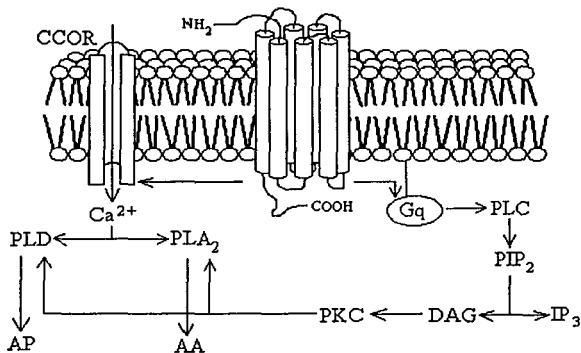
Los receptores muscarínicos M₂ y M₄ activan PLC a través de la proteína G_q aunque con menor eficiencia que los receptores M₁, M₃ y M₅. El receptor M₂ está relacionado con las subunidades α y el complejo $\beta\gamma$ de las proteínas G₁₂ y G₁₃ para activar PLC. El receptor M₂ expresado endógenamente en células FRTL5 inhibe PLC, sugiriendo que puede ocurrir regulación negativa en otros tipos celulares ¹⁰⁶.

En pulmón de rata, el receptor M_3 media la acumulación de AMPc, probablemente a través de ácido araquidónico y sus metabolitos ¹²³.

En células HEK-293 y HL-60, los receptores muscarínicos M_2 y M_3 estimulan la enzima esfingosina cinasa que fosforila esfingolípidos produciendo esfingosina 1-fosfato que actúa intracelularmente para provocar liberación de Ca^{2+} del almacén intracelular. Esfingosina cinasa es dependiente de iones Ca^{2+} . Se sugiere que la activación de la vía PLC-PIP₂-IP₃ que libera Ca^{2+} del retículo endoplásmico induce la activación de esfingosina cinasa a través de estos iones provocando finalmente la movilización de Ca^{2+} intracelular. Probablemente, en general los receptores acoplados a proteínas G pueden activar esta vía ¹²⁴.

5.2.2 Activación de PLD y PLA₂

En diversas líneas celulares, los receptores muscarínicos M_1 , M_3 y M_5 activan PLA₂ y PLD a través del influjo de iones Ca^{2+} y de la acción de PKC provocando la liberación de ácido araquidónico (esquema 5.1). Estas enzimas también pueden ser activadas por una vía independiente de PLC. En células de riñón embrionario de humano, estos receptores muscarínicos probablemente activan a estas fosfolipasas a través de las proteínas G_i o G_o ^{106, 125}.



Esquema 5.1 Activación de PLA₂ y PLD. Estas enzimas actúan sobre fosfolípidos de membrana para provocar la liberación de ácido araquidónico (AA) y ácido fosfatídico (AP). El influjo de Ca²⁺ probablemente es proporcionado por la activación directa de canales de Ca²⁺ operados por receptor (CCOR) ¹⁰⁶.

En músculo liso, la enzima PLA₂ puede ser activada directamente por el dímero βγ de proteína G, liberando ácido araquidónico, metabolito que puede activar directamente tanto canales de K⁺ como de Ca²⁺ ¹²⁶.

5.2.3 Modulación de canales iónicos

Distintos tipos de canales iónicos tales como canales de Ca²⁺ independientes de voltaje, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, canales catiónicos no selectivos y diversos tipos de canales de K⁺ pueden ser modulados por receptores muscarínicos.

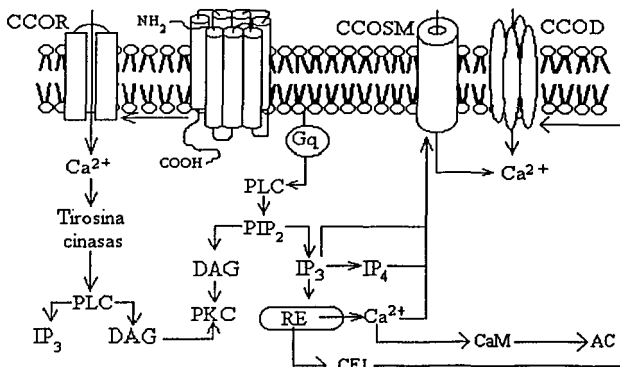
5.2.3.1 Canales de Ca²⁺ independientes de voltaje

Se ha demostrado que los receptores muscarínicos M₁, M₃ o M₅ interactúan con tres tipos de canales de Ca²⁺ independientes de voltaje que incluyen:

- ◆ Canales activados por receptores
- ◆ Canales activados por depleción
- ◆ Canales activados por segundos mensajeros

Muy probablemente estos canales sean activados a través de la vía del fosfatidilinositol tanto por la acción de PKC como de iones Ca^{2+} liberados intracelularmente por la actividad de IP_3 . La apertura de canales de Ca^{2+} independientes de voltaje provoca flujo de iones Ca^{2+} y aumento de los niveles intracelulares de este ión, el cual actúa como segundo mensajero activando canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros, induciendo la activación de calmodulina, la cual activa adenililciclase que aumenta los niveles de AMPc intracelular, y estimulando tirosina cinasas que inducen la activación de $\text{PLC-}\gamma$ ¹⁰⁶.

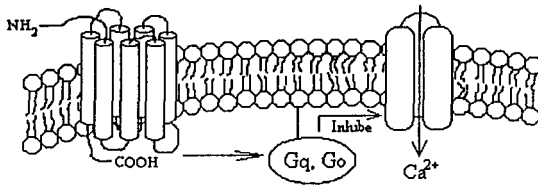
Los receptores M_1 , M_3 y M_5 activan canales de Ca^{2+} operados por receptor (CCOR) lo que provoca flujo de iones Ca^{2+} , los cuales estimulan tirosina cinasas que activan $\text{PLC}\gamma$, enzima que provoca la formación de IP_3 y DAG por hidrólisis de PIP_2 . Tanto el segundo mensajero IP_3 como su metabolito IP_4 y Ca^{2+} liberado intracelularmente por acción de IP_3 pueden activar canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros (CCOSM). El aumento intracelular de las concentraciones de Ca^{2+} permite la activación de canales operados por segundos mensajeros y también la activación de calmodulina, la cual activa adenililciclase para promover un aumento en los niveles de AMPc. Muy probablemente la acción de IP_3 sobre retículo endoplásmico provoca la liberación de un factor de flujo citoplásmico (CIF) que activa canales de Ca^{2+} operados por depleción (CCOD)¹⁰⁶. (Esquema 5.2).



Esquema 5.2 Activación de canales de Ca^{2+} independientes de voltaje. Estos canales pueden ser estimulados a través de segundos mensajeros o por acción directa del receptor.

5.2.3.2 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

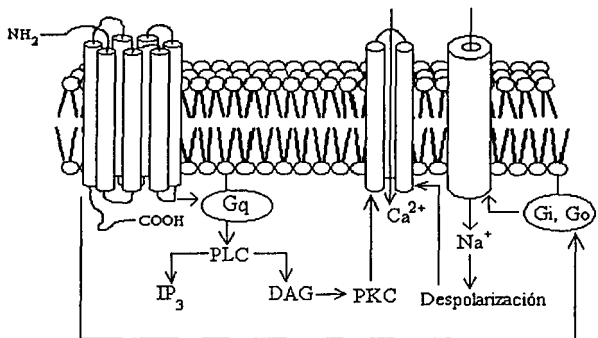
Los receptores muscarínicos modulan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que junto con los canales independientes de voltaje y la liberación de iones Ca^{2+} del retículo endoplásmico regulan los niveles de Ca^{2+} intracelular. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje comprenden los tipos L, N, P, Q y R, los cuales normalmente son estimulados por cambios en la polaridad de la membrana. En células NG108-15, los receptores M_2 y M_4 probablemente inhiben canales de Ca^{2+} tipo N a través de la proteína G_o y los modulan por cambios en su estado de fosforilación vía modificación de los niveles de AMPc (esquema 5.3). También pueden inhibir corrientes de Ca^{2+} tipo L a través de la familia de proteínas G_q (esquema 5.3). En neuronas de cerebro anterior basal de rata, el receptor M_2 inhibe corrientes tipo N, P, Q y R. Es probable que esta inhibición se lleve a cabo a través del complejo $\beta\gamma$ de la proteína G_o . Al parecer los receptores M_1 , M_3 y M_5 activan canales de Ca^{2+} tipos T, N y L a través de una clase desconocida de proteína G en el sistema nervioso ^{121, 127, 128}.



Esquema 5.3 Inhibición de canales de Ca²⁺ operados por voltaje. La inhibición puede ocurrir por acción de las proteínas G_q y G_o en neuronas y células musculares.

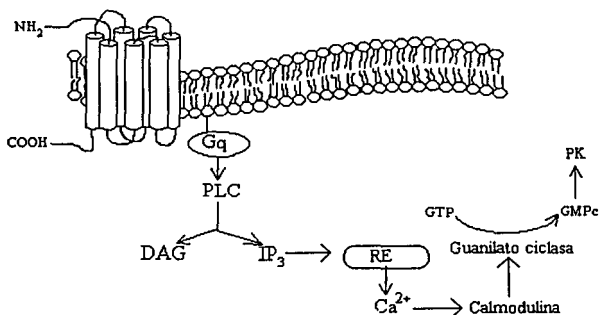
En músculo liso la activación de receptores muscarínicos M₁, M₃ y M₅ provoca aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular, provocado por el influjo a través de canales de Ca²⁺ independientes de voltaje y por la liberación de estos iones a partir del retículo endoplásmico, permitiendo la entrada de iones Na⁺ a través de canales catiónicos no selectivos aumentando así el potencial de membrana y dando lugar a la despolarización membranar. La apertura de canales de Na⁺ también puede ocurrir por acción de las proteínas G_i o G_o, que son activadas principalmente por el receptor M₂. El cambio de potencial de membrana ocasiona la apertura de canales de Ca²⁺ operados por voltaje, los que también son activados por PKC estimulada por la vía del fosfatidilinositol^{110, 121}.

Los canales de Ca²⁺ operados por voltaje también pueden ser activados por PKA a través de la vía de adenilciclasea¹²¹.



Esquema 5.4 Activación de canales de Ca²⁺ operados por voltaje. Este tipo de canales que son abiertos por cambios en la polaridad de la membrana, también son activados por acción de PKC.

En células cardiacas, el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular conduce a la activación de la enzima sintasa de óxido nítrico que es dependiente del complejo Ca²⁺/calmodulina, induciendo la síntesis de GMPc mediante activación de guanilato ciclasa ¹⁰⁷.



Esquema 5.5 Activación de guanilato ciclasa. El complejo Ca²⁺/calmodulina activa guanilato ciclasa, que cataliza la síntesis de GMPc a partir de GTP, conduciendo a la activación de proteína cinasas (PK).

El segundo mensajero GMPc puede inhibir canales de Ca^{2+} tipo L vía activación de proteína cinasa dependiente de GMPc o vía estimulación de fosfodiesterasa de AMPc estimulada por GMPc ¹¹⁶.

El control de los niveles de Ca^{2+} por activación de receptores muscarínicos, se lleva a cabo, principalmente por la liberación de estos iones del retículo endoplásmico por acción del segundo mensajero IP_3 y por el influjo a través de canales de Ca^{2+} dependientes e independientes de voltaje.

5.2.3.3 Canales catiónicos no selectivos

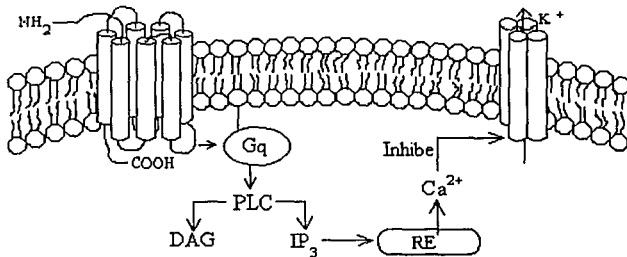
La contracción del músculo liso producida por la activación de los receptores M_2 o M_4 se lleva a cabo mediante la activación de canales catiónicos no selectivos, principalmente de Na^+ , incrementando la corriente interna catiónica que induce la despolarización de la membrana, proceso acelerado por Ca^{2+} y modulado por proteínas G. La apertura de canales catiónicos requiere al menos la unión de una subunidad α de proteína G. Una vez que la membrana se despolariza, ocurre el influjo de iones Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. Después de la despolarización de la membrana de células musculares, los canales de Ca^{2+} activados permiten una corriente interna de iones Ca^{2+} que mantiene la contracción con extensión variable que depende del tipo de músculo liso. También se sugiere la acción del receptor M_3 en esta vía. La restauración del potencial ocurre por la apertura de canales K_{Ca} y la consecuente hiperpolarización. Probablemente la hidrólisis de fosfatidilinositol activa indirectamente la conductancia de K^+ a través de la liberación de Ca^{2+} intracelular ^{108, 110}.

5.2.3.4 Canales de K^+

En neuronas, los receptores muscarínicos provocan efectos estimulatorios por cierre de uno o varios tipos de canales de K^+ y efectos inhibitorios por apertura de canales

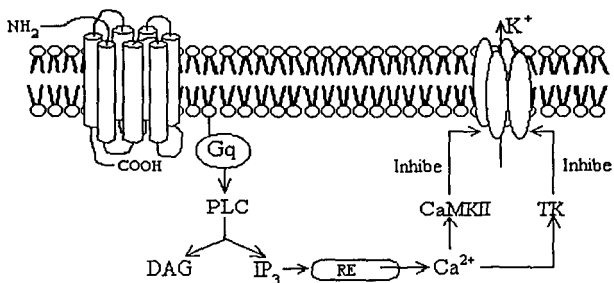
de K^+ y cierre de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ^{114, 128}. Los canales de K^+ cerrados incluyen:

a) **Canal de K^+ tipo M (K_M)**. Localizado principalmente en neuronas de hipocampo y neuronas corticales. Este canal puede ser cerrado por acción de Ca^{2+} liberado intracelularmente por actividad de IP_3 a través de la activación de las subunidades α y el dímero $\beta\gamma$ de proteínas G_q y/o G_{11} y G_{12} por los receptores M_1 y M_3 ¹²⁸.



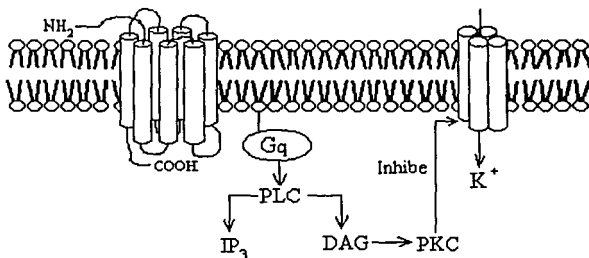
Esquema 5.6 Inhibición del canal de K_M por Ca^{2+} . La inhibición de este canal impide la liberación de iones K^+ .

b) **Canal de K^+ activado por Ca^{2+} (K_{Ca})**. Se encuentra principalmente en neuronas periféricas y en neuronas de hipocampo. Los iones Ca^{2+} liberados del retículo endoplásmico vía hidrólisis de fosfatidilinositol activada por los receptores M_2 y M_4 estimulan a la cinasa II calmodulina (CaMKII), la cual probablemente actúa directamente sobre el canal K_{Ca} para fosforilarlo y cerrarlo. También se sugiere la acción de una tirosina cinasa activada por Ca^{2+} ¹²⁸.



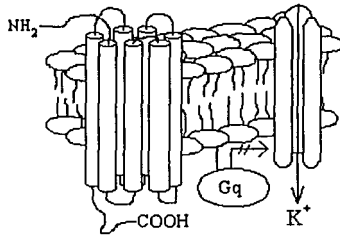
Esquema 5.7 Inhibición del canal K_{Ca}. Los iones Ca²⁺ activan a la cinasa II calmodulina y probablemente tirosina cinasas que inhiben canales K_{Ca}.

c) **Canal rectificador interno de K⁺ (K_{IR})**. Se ha localizado en neuronas de núcleo acumbens y de ganglio simpático de rata. Este tipo de canal probablemente sea cerrado por la acción del receptor M₁ a través de PKC ¹²⁸.



Esquema 5.8 Inhibición del canal K_{IR}. Muy probablemente PKC inhibe este canal impidiendo la entrada de iones K⁺.

d) **Corriente rectificadora lenta**. Localizada en neuronas de hipotálamo ventromedial. Este canal probablemente es cerrado a través de la acción directa de la subunidad α de la proteína G_q activada por un subtipo no identificado de receptor muscarínico ¹²⁸.



Esquema 5.9 Inhibición del canal K_{IR} de corriente lenta. La subunidad α de la proteína G_q inhibe este canal impidiendo la entrada de iones K^+ .

e) Corrientes de entrada rápida parecidas a canales tipo M. Estos canales de K^+ sensibles a voltaje parecidos a los canales K_M , los cuales se activan y desactivan más rápidamente, probablemente son cerrados a través de la acción del receptor M_3 y la presencia de Ca^{2+} extracelular, impidiendo la entrada de iones K^+ ¹²⁸.

f) Corrientes por goteo. Se refiere a canales de K^+ que permiten un flujo muy lento de iones en células piramidales de hipocampo, estos canales probablemente son cerrados a través de los receptores M_1 o M_3 ¹²⁸.

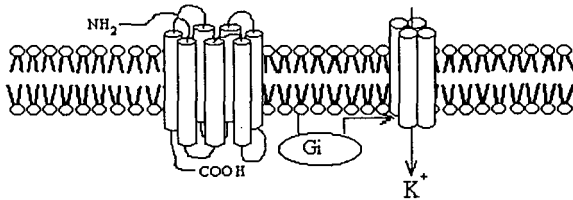
Los canales de K^+ que son abiertos por receptores muscarínicos comprenden los siguientes:

a) Canal K_{IR} . Probablemente es abierto por los receptores M_2 o M_4 a través del dímero $\beta\gamma$ de proteína G ¹²⁸.

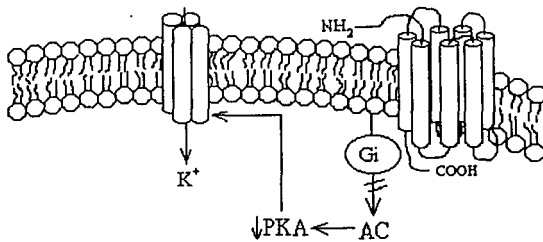
b) Canal K_{Ca} . Probablemente los receptores M_1 , M_3 y M_5 abren este tipo de canal a través de Ca^{2+} liberado por acción de IP_3 ¹²⁸.

En diversas neuronas de rata los receptores M_2 y M_4 inhiben canales de Ca^{2+} tipos L, N, P, Q y R ¹²⁸.

En células de corazón de mamífero y en la línea celular RBL-2H3 el receptor M_2 activa al canal K_{IR} a través de la subunidad α de G_i , aunque también se sugiere la intervención del complejo $\beta\gamma$ (esquema 5.10). En células AtT20 el receptor M_4 aumenta la conductancia de este tipo de canal. Sin embargo, en estas mismas células la activación de receptores muscarínicos modulan la actividad del canal K_{IR} por reducción en los niveles de AMPc, lo que reduce la actividad de PKA conduciendo a la disminución en el nivel de fosforilación del canal con la consecuente reducción de su conductancia (esquema 5.11) ^{27, 106, 121, 128, 129}.



Esquema 5.10 Activación del canal K_{IR} vía G_i . Esto ocurre muy probablemente a través de la subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ de G_i .¹²¹



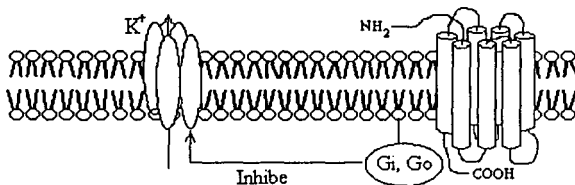
Esquema 5.11 Inhibición del canal K_{IR} por inhibición de adenililciclasa. La disminución de los niveles de AMPc reduce la actividad de PKA sobre el canal disminuyendo el influjo de iones K^+ .¹²¹

En miocitos cardiacos y células de músculo liso, el canal K_{IR} puede ser inhibido por la acción de PKC a través de la vía del fosfatidilinositol activada por los receptores M_1 , M_3 y M_5 ¹²¹.

En glándulas salivales y lagrimales así como en células aisladas de músculo liso de vías aéreas, gastrointestinal y genitourinaria, los receptores M_2 y M_4 activan la conductancia de K^+ , Cl^- y cationes, asociada con la liberación de Ca^{2+} intracelular y la activación sostenida de canales catiónicos no selectivos. Esta conductancia es activada indirectamente por estimulación de PLC y la consecuente liberación de Ca^{2+} por IP_3 . Los receptores M_1 , M_3 , y M_5 presentan esta vía en células A9L, CHO y NG108-15. En glándulas lagrimales, al parecer, Ca^{2+} se libera inicialmente del almacén intracelular, pero las concentraciones sostenidas parecen deberse al influjo de estos iones inducido por IP_4 ^{106, 115, 121, 128, 130}.

En células NG108-15, los receptores M_1 y M_3 , a través de proteínas G_q y/o G_{11} o por acción de segundos mensajeros derivados de fosfatidilinositol inhiben al canal K_M dependiente de voltaje. Aún no se conocen los segundos mensajeros involucrados en esta vía pero se sugiere la participación de PKC ^{121, 127, 128}.

En algunos tipos de músculo liso la estimulación del receptor M_2 provoca inhibición del canal K_{Ca} . Probablemente la inhibición de la actividad de este canal a un nivel fijo de Ca^{2+} es un componente importante del potencial postsináptico excitatorio sostenido. Aún no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual el receptor M_2 regula a este tipo de canal iónico, pero es evidente su actividad inhibitoria en el músculo. Se ha sugerido que la inhibición del canal K_{Ca} en algunos tipos de músculo liso ocurre a través de acción directa de proteínas G_i o G_o por activación del receptor M_2 (esquema 5.12) ^{110, 115}.



Esquema 5.12 Inhibición del canal K_{Ca} por G_i o G_o . Este canal puede ser inhibido por acción directa de las proteínas G activadas por receptores muscarínicos.

En células cardiacas de mamífero, el receptor M_2 a través de la proteína G_i activa un tipo de canal de K^+ denominado canal de alta conductancia (BK_{Ca}) que también es dependiente de Ca^{2+} ^{107, 108}.

En músculo liso gastrointestinal, el receptor M_2 se opone al aumento de AMPc induciendo relajación muscular, en tanto el receptor M_3 promueve contracción del músculo liso; el receptor M_2 abre canales catiónicos no selectivos provocando la entrada de Na^+ que promueve la despolarización y ocasiona entrada de iones Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} tipo L. La entrada de Na^+ es sinérgica con la liberación de Ca^{2+} por la vía del fosfatidilinositol estimulada por el receptor M_3 . Este canal se abre por acción de proteínas G, de PKC, tirosina cinasas o AMPc. El receptor M_2 también promueve la sensibilización de proteínas contráctiles a través de la proteína Rho. Estos procesos pueden conducir al proceso de acoplamiento excitación-contracción activado por receptores M_2 y M_3 ¹³¹.

5.2.4 Vía mitogénica

En muchos tipos celulares la activación de receptores acoplados a proteínas G promueve la estimulación de serina/treonina cinasas activadas por señal extracelular, denominadas Erk o MAPK ^{31, 122, 132}.

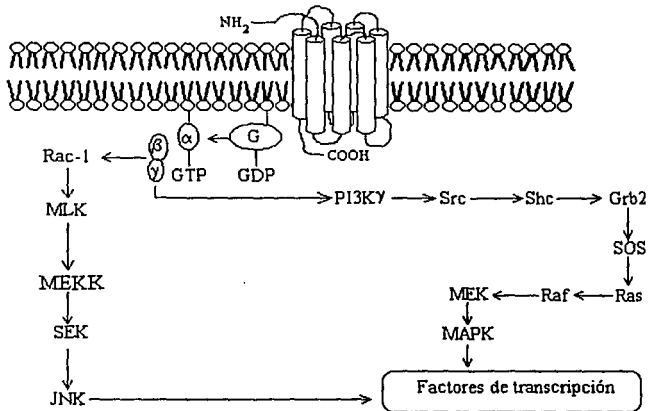
Los receptores muscarínicos M_1 y M_2 a través del complejo $\beta\gamma$ de proteínas G activan, de forma independiente dos vías mitógenicas, las cuales se conocen como la vía MAPK que conduce a la expresión de genes como c-fos y c-jun y la vía JNK que conduce específicamente a la activación del gene c-jun (esquema 5.13) ³¹.

La vía Ras/MAPK tiene lugar a partir de la activación de la proteína Ras o p21, la cual recluta hacia la membrana plasmática a la serina/treonina cinasa Raf o c-Raf-1 que a su vez activa la cascada de cinasas MEK1 y MEK2/Erk1 y Erk2 ^{31, 132}.

La vía Rac/JNK involucra la activación de proteínas de bajo peso molecular que ligan GTP tales como Cdc42 y Rac. La proteína Cdc42 se relaciona a la cinasa activada por p21 o Ras que activa proteínas que pertenecen a la familia MAPK, para activar a la proteína c-jun NH₂ cinasa (JNK), la cual fosforila al factor de transcripción c-jun ¹³². En células COS-7, los receptores M_1 y M_2 activan Erk2. Mientras el receptor M_1 lo hace tanto de forma dependiente como independiente del dímero $\beta\gamma$ de proteína G, el receptor M_2 lo hace solo a través de una vía dependiente de $\beta\gamma$. La señalización del receptor M_2 involucra la enzima PI3K γ , la cual desempeña una función importante en el acoplamiento del receptor a la vía MAPK. Al parecer PI3K γ requiere de tirosina cinasas como Src para fosforilar y activar a la proteína Shc, la cual se asocia a la proteína adaptadora Grb2 para activar SOS, proteína que desencadena la ruta Ras/MAPK. Esta vía de señalización conduce a la fosforilación de factores de transcripción que activan genes c-fos y c-jun ^{31, 122}.

Particularmente los receptores muscarínicos M_1 provocan mayor incremento en la expresión de RNAm de c-jun. La actividad del factor de transcripción c-jun es controlado por una nueva familia de enzimas estructuralmente relacionadas pero distintas de las MAPK. Estas enzimas llamadas Jun cinasas (JNKs) fosforilan selectivamente al dominio de transactivación NH₂-terminal de la proteína c-jun, incrementando su actividad transcripcional. En la línea celular NIH 3T3, los receptores acoplados a proteínas G pero no los de la clase de tirosina cinasa pueden activar la vía JNK. La activación de esta vía se realiza a través del dímero $\beta\gamma$ de la

proteína G que se acopla a Rac1 o a Cdc42, proteínas que pertenecen a la familia Rho de GTPasas, lo que permite el inicio de una nueva ruta bioquímica que conduce finalmente a la activación del gene c-jun^{31, 122}.



Esquema 5.13 Activación de las vías MAPK y JNK. Los receptores M₁ y M₂ a través de βγ de proteínas G estimulan PI3Ky, que promueve la activación de Src, la cual activa a Shc que estimula a las proteínas Grb2 y SOS, ésta promueve el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras, la cual estimula la vía Raf/MEK/MAPK. La vía JNK es estimulada a través de Rac1 que estimula MLK, proteína que desencadena la activación de MEKK/SEK/JNK.

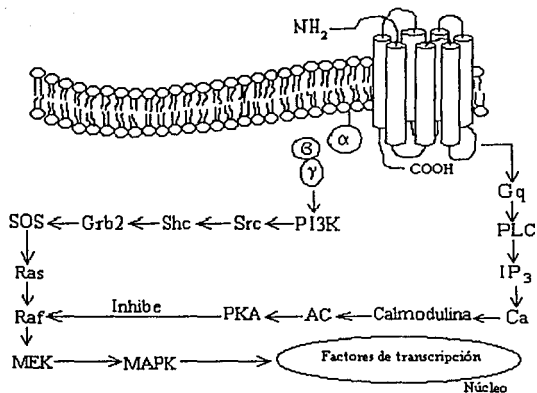
En músculo liso de vías aéreas de humano, el receptor M₂ activa proteínas Rho a través de la proteína G_i, conduciendo a la activación de vías mitogénicas. Las proteínas Rho son una subfamilia de las proteínas Ras, las cuales juegan un papel importante en la determinación del crecimiento celular. Son reguladoras de la actina del citoesqueleto por señales extracelulares en células aisladas. Median la potenciación de la contracción inducida por Ca²⁺ activada por agonistas de receptores muscarínicos en tejido vascular. La activación del receptor M₂ altera los filamentos de actina en músculo liso de vías aéreas para regular el tono muscular, se especula que lo hace acoplándose a la polimerización de actina y a la reorganización del citoesqueleto a través de la acción de tirosina cinasas¹³³.

Las proteínas Rho ligan GTP y desencadenan la vía mitogénica, esta subfamilia consiste en 9 miembros que incluyen Rho A, B, C y G; Rac1 y 2; Cdc42; G25K y TC10 ^{133, 134}.

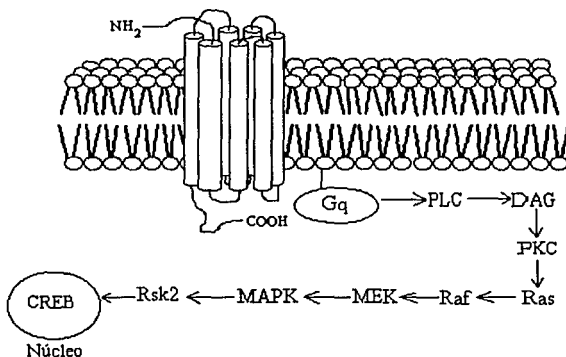
En la línea celular SH-SY5Y, el receptor M₃ activa una proteína denominada cinasa-1 asociada a Cdc42 Hs (ACK-1), que funciona como efector desencadenante de la familia Rho de GTPasas de bajo peso molecular. La proteína Cdc42 unida a GTP se asocia a ACK-1 y esto inhibe la actividad GTPasa de Cdc 42 estimulada por proteínas activadoras de GTPasa activando la vía mitogénica. Esta vía regula el crecimiento neural en cerebro de mamífero. En esta línea celular la activación del receptor M₃ aumenta la actividad fosforilante de residuos de tirosina de ACK-1, para lo cual se requiere la actividad de Cdc42 ¹³⁵.

Se ha demostrado que la activación de PKA por AMPc inhibe la activación de Raf. En células Rat-1a, el receptor M₁ activa PLCβ que provoca hidrólisis de fosfatidilinositol, lo cual produce IP₃ y DAG. El segundo mensajero IP₃ provoca liberación de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, el cual a través de la activación de calmodulina activa adenililciclase, enzima que promueve la formación de AMPc que activa PKA la cual inhibe la vía Raf/MEK/MAPK (esquema 5.14) ¹²².

En hipocampo de rata, los receptores muscarínicos también estimulan la vía MAPK activando finalmente al factor de transcripción CREB, el cual induce la expresión genética (esquema 5.15). Mediante la vía de la hidrólisis del fosfatidilinositol a través de PLC, DAG activa PKC, ésta fosforila y activa a la proteína Ras que a su vez activa a Raf-1 que fosforila a MEK, proteína que activa a MAPK, ésta probablemente a través de la proteína Rsk2 activa al factor de transcripción CREB ⁴⁰.



Esquema 5.14 Inhibición de la vía mitogénica por PKA. Diferentes isoformas de adenilicilasa funcionan como reguladores negativos de la vía mitogénica. La regulación de Raf y MAPK por AMPc ocurre fisiológicamente en respuesta a la estimulación hormonal. De esta forma la vía del fosfatidilinositol estimulada por receptores muscarínicos está involucrada en la inhibición de la vía mitogénica¹²².



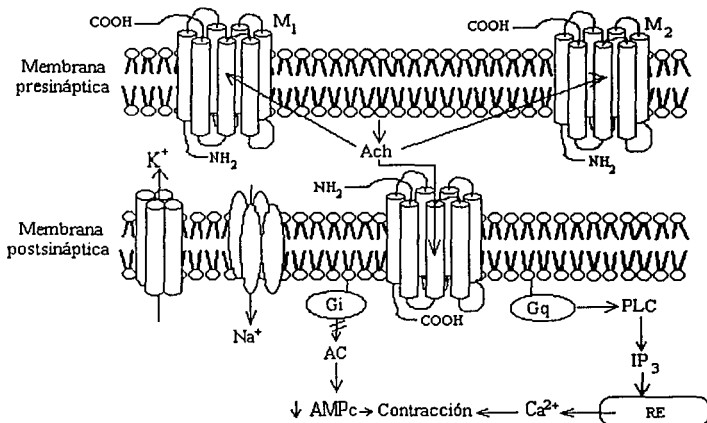
Esquema 5.15 Vía mitogénica activada en hipocampo de rata. La vía del fosfatidilinositol induce la expresión genética través de la activación del factor de transcripción CREB por acción de PKC sobre la proteína Ras, la cual desencadena la vía Raf/MEK/MAPK.

5.2.5 Receptores muscarínicos presinápticos

Se han detectado receptores muscarínicos presinápticos en terminales nerviosas parasimpáticas de vejiga urinaria de rata, los cuales regulan el mecanismo de retroalimentación negativa de la liberación de acetilcolina ¹³⁶. Se sugiere que en tráquea y vejiga urinaria de cobayo la activación del receptor M₄ presináptico provoca inhibición de la liberación de acetilcolina ^{137, 138}.

A través de estudios moleculares y funcionales se ha encontrado que en músculo liso de vejiga urinaria de rata existen receptores muscarínicos presinápticos M₁ facilitatorios y M₂ inhibitorios que facilitan y reducen la liberación de acetilcolina respectivamente ¹³⁹.

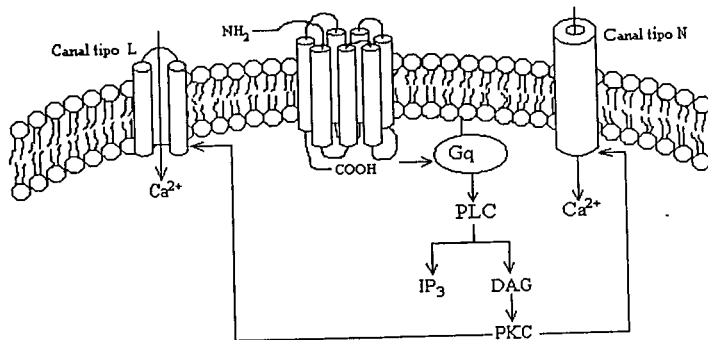
Se propone que el músculo liso de vejiga urinaria de rata, se encuentra relajado principalmente por acción de receptores adrenérgicos β estimulando la actividad de adenililciclase. Para provocar el vaciamiento de la vejiga, ocurre contracción del músculo por acción de acetilcolina sobre receptores muscarínicos postsinápticos, los cuales inhiben adenililciclase disminuyendo los niveles de AMPc, activan la vía del fosfatidilinositol elevando los niveles de Ca²⁺ intracelular y activan tanto canales de K⁺ como de Na⁺. La autorregulación de la liberación de acetilcolina, ocurre por interacción de este neurotransmisor con receptores muscarínicos localizados en la membrana presináptica (esquema 5.16) ¹¹⁹.



Esquema 5.16 Receptores muscarínicos presinápticos. La contracción del músculo liso de vejiga urinaria de rata es provocado por la estimulación de la vía del fosfatidilinositol y la inhibición de adenilato ciclasa por acción de receptores muscarínicos. El control de la liberación de acetilcolina se lleva a cabo a través de la interacción de este neurotransmisor con receptores muscarínicos presinápticos.

Los receptores M₁ facilitatorios aumentan marcadamente la liberación de acetilcolina durante la continua estimulación eléctrica. El mecanismo de acción de este receptor depende de PKC activada por DAG. En vejiga urinaria de rata, PKC fosforila canales de Ca²⁺ tipos L y N provocando su apertura (esquema 5.17) ¹⁴⁰.

En sistema nervioso central, el receptor M₂ presináptico inhibe la liberación de acetilcolina. Al parecer los receptores M₂ y M₃ inhiben la liberación de GABA y glutamato. En neuronas centrales y periféricas, el receptor M₁ aumenta la liberación de acetilcolina ^{121, 127, 128}.



Esquema 5.17 Señalización del receptor M₁ facilitatorio presináptico. Los iones Ca²⁺ inducen la fusión de la membrana de las vesículas sinápticas que contienen acetilcolina a la membrana plasmática de la terminal presináptica, ocasionando la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico.

6. Receptores de dopamina

6.1 Definición

Dopamina es la principal catecolamina que actúa principalmente a nivel del sistema nervioso central de diversas especies de mamíferos incluyendo al humano. Este neurotransmisor actúa a través de receptores específicos, los cuales pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Se han aislado cinco subtipos de receptores de dopamina que de acuerdo a sus características bioquímicas y farmacológicas se agrupan en dos familias denominadas D₁-like y D₂-like ^{141, 142, 143}.



Esquema 6.1 Clasificación de receptores de dopamina. Estos receptores han sido clonados de diferentes tejidos tales como humano, rata y bovino, y expresados en diversas líneas celulares. Se han detectado dos tipos de receptores D₂, denominados D_{2s} y D_{2L} ^{9, 144}.

Las subfamilias D₁-like y D₂-like comparten cierta homología estructural principalmente a nivel de las regiones transmembranales; sin embargo se distinguen porque D₁-like tiene un tercer bucle intracelular pequeño y una porción COOH terminal grande y D₂-like tiene un tercer bucle intracelular grande y una porción COOH terminal pequeña (figuras 6.1 y 6.2). Esto probablemente determina el acoplamiento diferencial a proteínas G ^{145, 146}.

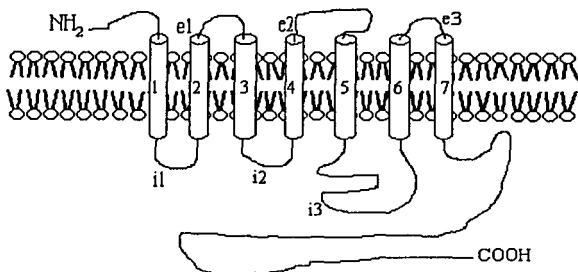


Figura 6.1 Modelo de receptor dopaminérgico D₁ de humano

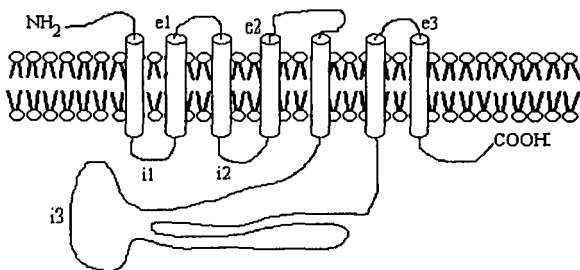


Figura 6.2 Modelo de receptor dopaminérgico D₂ de humano. Los receptores de dopamina poseen sitios de glicosilación en la porción NH₂-terminal y sitios de fosforilación y palmitolación en la porción COOH-terminal. El tercer bucle intracelular es más pequeño en la familia D₁-like que en la familia D₂-like ^{147, 148}.

El receptor dopaminérgico D₁ ha sido detectado principalmente en núcleo acumbens, corteza cerebral, amígdala, islotes de Calleja y núcleo subtalámico. El receptor dopaminérgico D₅ se ha encontrado en hipocampo, núcleo mamilar lateral y en el núcleo parafascicular del tálamo. Predominantemente el receptor D₂ se encuentra en corteza cerebral, tubérculo olfatorio y núcleo acumbens, en tanto el receptor D₃ se ha detectado en islotes de Calleja, núcleo septal, hipotálamo, tálamo, cerebelo, corteza

temporal, parietal y occipital. Al parecer el receptor D₄ se expresa en corteza frontal, amígdala, bulbo olfatorio, hipocampo, hipotálamo y mesencéfalo. En distintas regiones cerebrales, los receptores D₂-like son pre y postsinápticos, en tanto los receptores D₁-like son exclusivamente postsinápticos ^{9, 141, 143, 147, 149, 150, 151}.

Los receptores dopaminérgicos D₁-like también están distribuidos periféricamente en diferentes tejidos que incluyen capa mesentérica, arteria esplénica y corteza renal, en tanto los receptores D₂-like están presentes en retina, corazón, glándula pituitaria y arteria mesentérica ^{152, 153}. Ambas familias de receptores dopaminérgicos se encuentran en vasos renales, células yuxtglomerulares y túbulos renales de humano, conejo y rata, así como en vasos sanguíneos, miocardio, tracto gastrointestinal, cuerpo carotídeo, páncreas, bazo y timo de diversas especies de mamíferos ^{154, 155}.

Estos receptores están involucrados en procesos de regulación neuronal del control motor, procesos cognitivos, eventos de predicción, emoción y función vascular. Se han implicado en el mantenimiento y expresión de enfermedades neuropsiquiátricas tales como la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Tourette, el desorden de hiperactividad y déficit de atención, adicción y esquizofrenia ¹⁵⁶.

La activación del receptor dopaminérgico D₁ produce natriuresis, diuresis, incremento en la secreción de renina, incremento en el tono del esfínter esofageal, relajación del músculo longitudinal gástrico, acciones citoprotectivas y estimulación de la secreción exócrina pancreática. El receptor dopaminérgico D₂ está involucrado en la regulación de la presión sanguínea ¹⁵⁵.

En diversas regiones de cerebro de mamífero, los receptores dopaminérgicos D₂ y D₃ están presentes como autorreceptores, desempeñando un importante papel en la regulación de la liberación de dopamina ^{149, 151}.

Para la identificación de receptores dopaminérgicos, se han empleado diversos agonistas que incluyen: quinpirrol, apomorfina, bromocriptina, 7-OH-DPAT, SKF-38393, fenoldopam, entre otros. Entre los antagonistas usados se encuentran: AJ-76, butaclamol, clozapina, clorpromazina, domperidona, haloperidol, spiperona, racloprida, remoxiprida, risperidona, SCH-23390, U99194A y UH-232 ^{141, 143, 152}.

6.2 Vías de señalización

Los receptores de dopamina se acoplan a sistemas efectores como: adenililciclase PLC, PLA₂, PLD, canales iónicos, la bomba ATPasa de Na⁺/K⁺, el intercambiador Na⁺/H⁺ y la vía mitogénica induciendo la activación de factores de transcripción. No se conocen con detalle todas las vías de señalización activadas por esta clase de receptores, pero se sabe que actúan a través de diversas proteínas G ^{143, 156, 157}.

6.2.1 Adenililciclase

En diversas regiones de cerebro de rata y humano, así como en riñones de rata los receptores dopaminérgicos D₁-Like activan adenililciclase principalmente a través de la proteína G_s, elevando los niveles de AMPc que activa PKA. La inhibición de la actividad de adenililciclase es una propiedad general de los receptores dopaminérgicos D₂-Like reduciendo los niveles de AMPc principalmente a través de su interacción con proteínas G_i y G_o en diversas líneas celulares que incluyen células CHO, JEG-3 y células NG108-15 (esquema 1.1) ^{9, 141, 143, 158}.

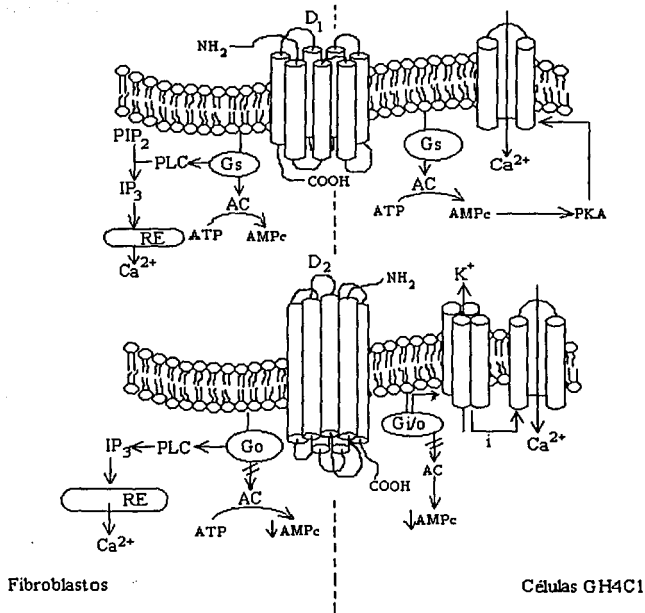
6.2.2 Hidrólisis de fosfatidilinositol

En fragmentos de cuerpo estriado de rata los receptores dopaminérgicos D₁-Like estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositol a través de PLC. El receptor D₂ estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol y provoca liberación de Ca²⁺ del almacén intracelular en células CHO, Ltk y CCL1.3; en células GH4C1 activa la hidrólisis de fosfatidilinositol a través de la proteína G_q (esquema 2.1) ^{141, 142}.

6.2.3 Canales iónicos

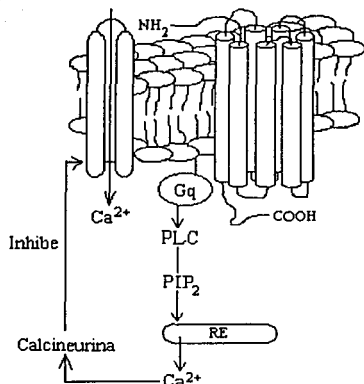
La estimulación de receptores dopaminérgicos D₁-Like incrementa corrientes de Ca²⁺ tipo L y reduce corrientes de Ca²⁺ tipos N y P en neuronas de cuerpo neoestriado de rata y en la línea celular GH4C1 vía acción directa o indirecta de PKA. En células de glomerulosa adrenal de rata, inhiben corrientes de Ca²⁺ tipo T. Los receptores dopaminérgicos D₂-Like pueden inhibir corrientes de Ca²⁺ tipo N a través de las subunidades α de proteínas G_i y G_o en interneuronas colinérgicas de cuerpo neoestriado de rata y median la inhibición de la actividad de canales de Ca²⁺ en melanotropos. La inhibición de corrientes de Ca²⁺ por activación de receptores dopaminérgicos D₂-Like en células GH4C1 y NG108-15, puede ocurrir a través de dos mecanismos, uno que involucra activación de corrientes de K⁺ causando alteraciones en el potencial de la membrana y otro que implica acción de proteínas G inhibiendo canales de Ca²⁺ ^{142, 143}.

En fibroblastos de ratón, el receptor dopaminérgico D₁ se acopla a la proteína G_s para activar adenililciclase y elevar los niveles de AMPc, esta misma proteína G se acopla a PLC para activar la hidrólisis de fosfatidilinositol y producir IP₃ y DAG. En tanto el receptor dopaminérgico D₂ se acopla a la proteína G_o que inhibe AC y disminuye los niveles de AMPc, y se acopla a PLC para hidrolizar fosfatidilinositol y producir IP₃ que libera Ca²⁺ del retículo endoplásmico. En células GH4C1, el receptor dopaminérgico D₁ se acopla a la proteína G_s para activar adenililciclase y elevar los niveles de AMPc, el cual activa PKA que fosforila y abre canales de Ca²⁺ tipo L. En células GH4C1, el receptor dopaminérgico D₂ se acopla a las proteínas G_i y G_o para inhibir adenililciclase reduciendo los niveles de AMPc. Las proteínas G_i y G_o activadas se acoplan a canales de K⁺ para activarlos y permitir la salida de estos iones, esto ocasiona un cambio en la polaridad de la membrana, lo cual permite el cierre de canales de Ca²⁺ (esquema 6.2) ¹⁵⁹.



Esquema 6.2 Señalización receptores D₁ y D₂ en fibroblastos Ltk de ratón y en células GH4C1. Tanto la proteína G_s como la proteína G_o estimuladas por receptores dopaminérgicos activan PLC para producir IP₃. La proteína G_s activa adenilciclasa mientras que G_o inhibe la actividad de esta enzima. En células GH4C1, las proteínas G_i y G_o abren canales de K⁺ modificando la polaridad de la membrana, fenómeno que ocasiona la inhibición de canales de Ca²⁺, en tanto, PKA abre canales de Ca²⁺.

En neuronas de cuerpo estriado de rata, la estimulación del receptor dopaminérgico D₂ suprime corrientes de Ca²⁺ tipo L a través de la activación de calcineurina por iones Ca²⁺ liberados intracelularmente por acción de IP₃ en la vía del fosfoinosítido, produciendo disminución de la excitabilidad (esquema 6.3). En estas células, los receptores D₂ activan PLC-β a través del dímero βγ de proteína G¹⁶⁰.



Esquema 6.3 inhibición de canales de Ca²⁺ tipo L por acción de calcineurina. Los iones Ca²⁺ liberados del retículo endoplásmico por acción de IP₃, activan a la fosfatasa dependiente de Ca²⁺, calcineurina, la cual inhibe canales de Ca²⁺ tipo L reduciendo el influjo de estos iones.

Los receptores dopaminérgicos D₁-Like incrementan corrientes de K⁺ en células retinales de pollo pero inhiben este eflujo en neuronas cerebrales de rata. Las corrientes de K⁺ en diversos tejidos como cuerpo estriado, neuronas dopaminérgicas mesencefálicas, lactotrofos, melantropos y células NG108-15 son incrementadas por la activación de receptores dopaminérgicos D₂-Like, conduciendo a hiperpolarización. Las isoformas de receptores dopaminérgicos D_{2L} y D_{2S} parecen modular diferencialmente las corrientes de K⁺ a través de la interacción con diferentes proteínas G. El receptor D_{2S} inhibe corrientes de K⁺ dependientes de voltaje en células NG108-15 a través de un mecanismo que incluye Ca²⁺ liberado intracelularmente y captado al interior por influjo a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje ^{141, 142, 143, 161}.

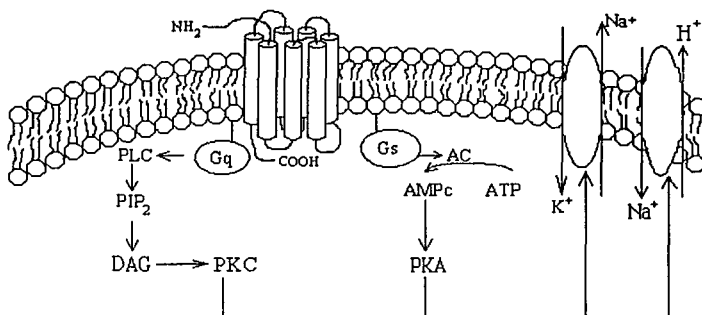
Los receptores dopaminérgicos D₁-Like están involucrados en la inhibición de la bomba ATPasa de Na⁺/K⁺ y de la actividad del intercambiador Na⁺/H⁺. Los receptores dopaminérgicos D₂-Like inhiben la actividad ATPasa de Na⁺/K⁺,

probablemente a través de la actividad de PKA o PKC en túbulo colector de riñones de rata. El receptor dopaminérgico D₁ inhibe la bomba ATPasa de Na⁺/K⁺ en células de retina de pollo, probablemente a través de un mecanismo que involucra PKA y PKC ^{142, 154, 156, 162}.

El receptor dopaminérgico D₄ está involucrado en la estimulación del intercambiador Na⁺/H⁺, activación del canal K_{IR}, inhibición de canales de K⁺ y Cl⁻ dependientes de voltaje, y en algunas líneas celulares provoca influjo de iones Cl⁻ ¹⁶³.

En células de túbulo renal de rata, el intercambiador Na⁺/H⁺ es inhibido por la acción de PKA activada por AMPc, mientras en túbulo contorneado proximal la estimulación de PLC vía hidrólisis de fosfatidilinositol inactiva a este intercambiador (esquema 6.4). Es probable que la inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ y de la enzima ATPasa de Na⁺/K⁺ (esquema 6.4) tengan efecto sinérgico sobre la inhibición de la reabsorción de Na⁺, lo cual podría conducir a un incremento en la excreción renal de este ión ^{142, 154, 162, 164}.

En células de osteosarcoma de rata y astrocitos de humano los receptores dopaminérgicos D₂ inhiben el intercambiador Na⁺/H⁺ provocando aumento de la acidez intracelular, probablemente a través de la vía de adenililciclasa ¹⁶⁵.



Esquema 6.4 Inhibición del intercambiador Na⁺/H⁺ y la bomba ATPasa de Na⁺/K⁺. Los receptores dopaminérgicos D₁-Like y D₂-like a través de PKC y PKA inhiben estos transportadores ¹⁵⁴.

6.2.4 Liberación de ácido araquidónico

Los receptores dopaminérgicos D₂ potencian la liberación de ácido araquidónico cuando aumenta la concentración de Ca²⁺ en células CHO, en tanto los receptores D₁ no presentan tal efecto. En células de cuerpo estriado de rata, los receptores D₂ estimulan la síntesis de ácido araquidónico y los receptores D₁ la inhiben. En células CHO, los receptores D₄ potencian la liberación de ácido araquidónico ^{141, 142, 143}.

En células GH4C1, el receptor D_{2S} activa PLD de forma independiente de PLC y probablemente independiente de las proteínas G_i y G_o, involucrando un tipo de PKC ϵ que no es dependiente de Ca²⁺. La PKC ϵ es necesaria para la activación de PLD, proceso que probablemente se lleve a cabo a través de la activación directa por la proteína Rho, la cual es activada directamente por el receptor D_{2S}. La activación de PLD cataliza la hidrólisis de fosfatidilcolina a ácido fosfatídico y colina, ácido fosfatídico actúa como segundo mensajero ¹⁶⁶.

6.2.5 Vía mitogénica

Los receptores D₂-Like activan la vía MAPK^{156, 163}. En células CHO y en la línea celular NG108-15, los receptores D₂ y D₃ estimulan la vía mitogénica activando fosforilaciones de diversas proteína cinasas activadas por mitógeno. El receptor D₃ en cerebro de mamífero probablemente se acopla a la inducción del factor de transcripción c-fos^{151, 167}.

La cascada MAPK es estimulada por los receptores dopaminérgicos D₂-Like en cuerpo estriado de rata. Esta vía juega un importante papel en la mediación de la respuesta locomotora hipersensible. En células SK-N-MC, los receptores dopaminérgicos D₂ y D₄ activan a la proteína Erk vía proteínas G a través de las proteínas Src, Shc y Grb2¹⁶⁸.

6.2.6 Acoplamiento a proteínas G

Las principales proteínas G que participan en las vías de señalización de los receptores de dopamina y los correspondientes efectores se presentan en las tablas 6.1 y 6.2^{156, 163}.

Receptor	Proteína G
D ₁	G _s , G _o , G _{i1} , G _{i2}
D ₅	G _s , G _z
D _{2S}	G _{i1} , G _{i2} , G _z , G _o
D _{2L}	G _{i2} , G _{i3} , G _z , G _o
D ₃	G _s , G _{i1} , G _{i2} , G _{i3} , G _q , G _z
D ₄	G _z , G _{oB} , G _{i2}

Tabla 6.1 Proteínas G que se acoplan a receptores dopaminérgicos

Proteína G	Sistema efector
G _s	Activa adenililciclase
G _i	Inhibe adenililciclase, activa canales iónicos y activa la vía MAPK
G _o	Inhibe adenililciclase y abre canales de Ca ²⁺ operados por voltaje
G _z	Inhibe adenililciclase
G _q	Activa PLC y puede inhibir PKC

Tabla 6.2 Efectores modulados por proteínas G

En regiones cerebrales de ratón tales como corteza cerebral, cuerpo estriado, tubérculo olfatorio, núcleo amigdaloides e hipocampo, existen proteínas G_o a las cuales se acoplan receptores dopaminérgicos D₂. El dímero βγ de la proteína G_o ha sido relacionado con la activación de PLCβ, el canal K_{IR}, tipos II y IV de adenililciclase, tipos β y γ de PI3K, inhibición de adenililciclase tipo I y diversos tipos de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La subunidad α de la proteína G_o inhibe algunos tipos de adenililciclase, activa ciertos tipos de canales de K⁺, en hipocampo interactúa con proteínas activadoras de GTPasa¹⁵⁷.

DISCUSIÓN

La activación de los receptores adrenérgicos α ocasiona la hidrólisis de fosfatidilinositol a través de la familia de proteínas $G_{q/11}$. La vía de adenililciclase es estimulada por la proteína G_s . Estos receptores activan canales de Cl^- por medio de G_i y PIP_3 despolarizando a la membrana para permitir la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Los segundos mensajeros glicerofosfoinosítido 4-fosfato y 4,5-difosfato inhiben al intercambiador Na^+/Ca^{2+} . La liberación de ácido araquidónico es provocada por la acción de PLA_2 y PLD sobre fosfatidilcolina y fosfatidilserina. Estas fosfolipasas son activadas por las vías del fosfatidilinositol y adenililciclase. La expresión genética activada por estos receptores adrenérgicos se lleva a cabo a través de la familia de proteínas $G_{q/11}$, las cuales estimulan cinasas que promueven vía mitogénicas.

La estimulación de los receptores adrenérgicos β activa principalmente la vía de adenililciclase, por medio de la cual se abren diversos canales iónicos como: canales de K_{Ca} , K_{IR} , K_{ATP} , Ca^{2+} tipo L y Cl^- , y probablemente se inhiban canales de Na^+ . La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje está directamente relacionada con la generación de contracción muscular, en tanto, la apertura de canales de K^+ promueve hiperpolarización de la membrana plasmática. Las proteínas G_s y G_i abren directamente canales de K^+ . En algunos tipos de células, PKA y la proteína G_q estimulan al intercambiador Na^+/H^+ . La expresión genética es activada por acción de PKA sobre la proteína Ras o bien sobre la tirosina cinasa Src. La activación de la vía mitogénica por el receptor β_1 promueve la apoptosis, en tanto el receptor β_2 a través de una ruta mitogénica distinta evita la destrucción celular.

Los receptores muscarínicos estimulan la vía del fosfatidilinositol a través de las proteínas G_q , G_{i2} y G_{i3} . Esta ruta de señalización puede ser inhibida por proteínas G_i , G_o y probablemente G_z . Inhiben adenililciclase por acoplamiento a proteínas G_i , G_o y probablemente G_z . También promueven la acumulación de $AMPc$ por activación de adenililciclase. Estimulan la liberación de ácido araquidónico por activación de PLA_2 y PLD .

probablemente a través de PKC, G_i o G_o . A través de la vía del fosfatidilinositol o por acoplamiento directo, activan canales de Ca^{2+} independientes de voltaje. Por medio de PKC, PKA o por despolarización ocasionada por la apertura de canales de Na^+ , estimulan corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Este tipo de corrientes también pueden ser inhibidas por las proteínas G_q y G_o , por proteína cinasas dependientes de GMPc o por estimulación de fosfodiesterasa de AMPc por acción de GMPc. En neuronas cierran canales de K_M , K_{Ca} , K_{IR} y otros tipos de rectificadores internos de K^+ por acción de G_q , PKC, Ca^{2+} , tirosina cinasas y cinasa II calmodulina. La proteína G_q abre directamente al canal K_{IR} . En estas células, los receptores muscarínicos también cierran canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. En miocitos cardíacos, la proteína G_i abre al canal K_{IR} y un canal de K_{Ca} de alta conductancia, la familia de proteínas $G_{q/11}$ inhiben al canal K_M . En músculo liso, G_i y G_o inhiben al canal de K_{Ca} . Estos receptores promueven la expresión genética a través de vías mitogénicas activadas por proteínas G que estimulan PI3K o Rac-1. La vía mitogénica puede ser inhibida por PKA. La liberación de acetilcolina es regulada por receptores muscarínicos facilitatorios e inhibitorios localizados en la membrana presináptica de terminales colinérgicas. También controlan la liberación de otros neurotransmisores.

Los receptores de dopamina activan pero también inhiben la vía de adenililciclase, activan e inhiben varios tipos de canales iónicos incluyendo canales de Ca^{2+} y de K^+ . Generalmente inhiben la actividad de la bomba ATPasa de Na^+/K^+ y al intercambiador Na^+/H^+ a través de PKA y PKC. Promueven la liberación de ácido araquidónico y estimulan la expresión genética. Normalmente se acoplan a las familias de proteínas G_s , G_i y G_q .

La activación de las vías de adenililciclase y fosfatidilinositol por los receptores acoplados a proteínas G, finalmente incrementan los niveles de Ca^{2+} , ya sea liberando estos iones del retículo endoplásmico o bien abriendo canales de Ca^{2+} dependientes e independientes de voltaje, principalmente por la actividad fosforilante de PKA y PKC. La apertura de estos canales también se lleva a cabo por cambios en la polaridad de la membrana ocasionados por apertura de canales catiónicos no

selectivos y canales de Cl^- . Los iones Ca^{2+} estimulan a una gran diversidad de estructuras proteicas que, entre otras, incluyen canales de K^+ , canales de Ca^{2+} operados por segundos mensajeros, PLA_2 , PLD , PLC , tirosina cinasas que activan vías mitogénicas y fosfatasas como calcineurina. Activan adenililciclase a través de calmodulina elevando los niveles de AMPc , permiten la activación de PKC por DAG , activan proteínas contractiles en diversos tipos de células musculares, promueven también la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico e inhiben algunas isozimas de adenililciclase. Junto con los canales de K^+ , están involucrados ampliamente en los procesos de contracción y relajación muscular.

Algunas clases de canales de Ca^{2+} pueden ser directamente abiertos por receptores activados por la unión del agonista. Es claro que Ca^{2+} desempeña funciones muy importantes en las células, pues distintas vías de señalización activadas por varios tipos de receptores finalmente elevan los niveles intracelulares de este ion.

Las vías de señalización activadas por la unión de agonistas a los receptores acoplados a proteínas G, dependen principalmente de las estructuras subcelulares expresadas en determinados tipos de células, la clase de receptor que se active y la especie en la cual se detecten dichas vías.

CONCLUSIONES

El conocimiento de las vías de transducción de señales desencadenadas por la activación, por acción de agonistas, de los receptores α_1 - y β -adrenérgicos, muscarínicos y de dopamina, nos ayuda a comprender el mecanismo de acción de los fármacos que interactúan con este tipo de receptores, ya que a través de esta información es posible explicar, desde el punto de vista molecular, la acción ejercida por el fármaco al establecer interacciones químicas con su receptor y el efecto que por consecuencia se produce.

Las vías de señalización explicadas en el presente trabajo también nos dan una idea de la gran cantidad de información existente respecto a la forma en que muchas sustancias endógenas producen sus efectos.

GLOSARIO

Agonista. Fármaco que presenta afinidad por receptores fisiológicos determinados, y que además tiene eficacia o actividad intrínseca, lo cual es determinado por las modificaciones conformacionales que sufre el receptor por la interacción del fármaco, desencadenando una respuesta fisiológica.

Apoptosis. Es un tipo de muerte celular que constituye un proceso fisiológico irreversible que ocurre de forma habitual en los organismos eucariotas pluricelulares, tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta. La apoptosis o muerte celular programada constituye la etapa final del curso fisiológico de la célula normal.

Astrocitoma. Tumor formado por astrocitos.

Astrocitos. El término proviene del griego *aster*, estrella y *kytos*, hueco. Se denomina así a ciertas células de neuroglia que forman un tejido de empaquetamiento en el sistema nervioso central. Estas células tienen muchas prolongaciones finas y están dispersas por todo el sistema nervioso central, en particular alrededor de las sinapsis donde aíslan las terminaciones nerviosas unas de otras. Algunas de estas prolongaciones están en contacto con neuronas, otras se aplican a las membranas basales de capilares.

Autacoide. Del griego *Autos*, propio y *Akos*, remedio o agente medicinal. Término que se aplica a sustancias químicas con actividad fisiológica y farmacológica que a diferencia de las hormonas, llegan a su sitio de acción, sin que en ello medie la circulación. Se consideran mediadores químicos locales, los cuales tan pronto como son liberados, son rápidamente absorbidos o destruidos, de forma que sólo actúan sobre las células localizadas en su entorno inmediato.

Automaticidad cardiaca. funcionamiento del corazón regulado por el sistema nervioso autónomo, tanto por fibras nerviosas simpáticas como por fibras paraimpáticas.

Canales iónicos. Son proteínas integrales de membrana que tienen una estructura característica tal, que en estado activo permiten el flujo de iones a través de la membrana. Existen diversos tipos de canales iónicos, los cuales pueden ser activados por cambios en el potencial de membrana, por fosforilación de residuos de serina y treonina, por interacción de ligandos, por acoplamiento de proteínas G o por acoplamiento directo de receptores.

Canal rectificador interno. Canal iónico que permite el flujo de iones hacia el interior celular, donde normalmente existe mayor concentración de éstos, por ejemplo el canal rectificador interno de K^+ .

Carcinoma. Tumor maligno del tejido epitelial que deriva del epitelio de superficie. Si el tumor proviene del epitelio glandular se denomina adenocarcinoma.

Células acinares. Células del páncreas que tienen erminaciones tipo saco.

Citoesqueleto. También conocido como almacén celular, es un retículo microtrabecular que une a todos los componentes celulares en una unidad estructural y funcional única. Este retículo no es una estructura estática, pues responde con cambios morfológicos a cambios fisiológicos. Está formado por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios.

Cuerpos carotídeos. Pequeños cuerpos localizados en las bifurcaciones de la carótidas, contienen receptores sensitivos especializados sensibles a la falta de oxígeno denominados quimiorreceptores. Están provistos de abundante riego sanguíneo a través de una pequeña arteria nutricia.

Depleción. disminución de la cantidad de líquidos, especialmente de la sangre del cuerpo o de un órgano. También se aplica a la disminución de la concentración de iones en la célula.

Dominio de transactivación. Región de la estructura proteica a la cual se enlaza la sustancia activante, para provocar un cambio conformacional y activarla.

Efecto cronotrópico positivo. Es el efecto que produce aumento de la frecuencia cardíaca.

Efecto inotrópico positivo. Es el efecto que origina aumento de la fuerza de contracción del músculo cardíaco, y que tiene lugar al disminuir el intervalo entre las contracciones.

Eflujo. Se refiere a la salida de iones a través de canales iónicos.

Esfingolípido. Lípido que contiene esfingosina, incluye a las ceramidas, cerebrósidos, gangliósidos y esfingomielinas.

Factores de crecimiento. son polipéptidos que actúan sobre células sanguíneas, células de los tejidos mesenquimatosos y epitelial, y neuronas, entre otros tipos celulares. Modulan la proliferación celular, activan una serie de señales intracelulares que, entre otros efectos, promueven el ensamblaje de los complejos ciclinas-CdK (cinasas dependientes de ciclinas). Regulan la transcripción de varios genes que intervienen en la proliferación celular, entre los que se encuentran los proto-oncogenes como: myc, fos y jun; y los genes supresores de tumores como: el gen Rb y el gen p53.

Factores de transcripción. Proteínas que se unen a una secuencia de DNA denominada promotor funcional que atrae las RNA polimerasas I, II y III. Existen tres tipos de factores diferentes, uno para cada tipo de RNA polimerasa.

Feocromocitoma. Tumor de células cromafines que suele ser benigno pero puede dar metástasis.

Ganglios. Cuerpos celulares de muchas neuronas autónomas periféricas acumuladas y que forman hinchazones en el curso de los troncos nerviosos. Este término también se utiliza en general incluso para las neuronas autónomas periféricas cuyos cuerpos celulares no están agregados en ganglios.

Gene. Es una secuencia particular de nucleótidos a lo largo de una molécula de DNA, o de RNA en ciertos virus, que representa una unidad funcional de herencia.

Glicosilación. Agregación de residuo de carbohidratos a ciertos residuos de aminoácidos del receptor.

Glioma. Tumor de células gliales. Si proviene de astrocitos se denomina astrocitoma, si se origina de oligodendrocitos se llama oligodendroglioma.

Hipoxia. Se aplica a la cantidad disminuida de oxígeno respecto a la que normalmente están expuestos los tejidos.

Hormonas. Sustancias químicas activas, que por su naturaleza química se clasifican en: esteroides, proteínas simples o glucoproteínas y polipéptidos o derivados de aminoácidos. Son segregadas por células de glándulas endocrinas directamente al torrente vascular y reconocidas por células de tejidos blanco específicos, los cuales responden en forma característica. Actúan como mensajeros químicos del sistema endocrino en concentraciones bajas, del orden de hasta 10^{-8} M. Por el lugar en que se localiza su sitio de acción pueden clasificarse como: hormonas con función paracrina, que actúan sobre células adyacentes al tejido de secreción; hormonas con función autocrina, que tienen acción sobre las células en las cuales son sintetizadas; y hormonas generales, que actúan a distancia.

Influjo. Este término se refiere a la entrada de iones a la célula a través de canales iónicos selectivos o no para este ión.

Isozimas. Estructuras macromoleculares con la misma actividad catalítica pero con diferentes propiedades físicas y químicas. Pueden existir formas físicamente distintas de la misma actividad catalítica en diferentes tejidos del mismo organismo, en diferentes tipos celulares de un mismo tejido o aun en microorganismos procariotas como *Escherichia coli*. En medicina clínica las isozimas son las formas distintas y físicamente separables de una enzima dada, presentes en tipos celulares diferentes de un eucariota específico, como el ser humano.

Mesangio. Membrana delgada que sostiene los capilares renales.

Miocitos. Se denominan así a las fibras musculares.

Mitogénesis. Este término se refiere a la generación de mitosis. Se aplica para identificar la acción de agonistas o de sustancias endógenas, relacionada con la activación de cascadas de señalización que finalmente promueven la mitosis.

Neuroblastoma. Tumor maligno de células nerviosas, compuesto principalmente por neuroblastos.

Neurotransmisor. Sustancia química sintetizada en el cuerpo neuronal o en la terminación axónica, donde se almacena en vesículas sinápticas, de las cuales es liberada al espacio sináptico por un proceso de exocitosis, para difundir a la membrana post-sináptica y establecer interacciones químicas con receptores específicos, los cuales se activan y provocan cambios en el potencial de la membrana, así como alteraciones en el metabolismo de la célula post-sináptica. Pueden provocar efectos estimulatorios o inhibitorios.

Osteosarcoma. Se denomina así al tumor maligno maligno del hueso.

Palmitolación. Agregación de ácido palmítico a residuos de aminoácidos de los receptores.

Retículo sarcoplásmico. Se denomina así al retículo endoplásmico liso de la fibras musculares.

Rodopsina. Es la molécula fotosensible de los discos de los bastones retinianos, lo cual consta de una proteína, la opsina, y de un grupo prostético, el 11-cis-retinal. Se trata de una proteína de membrana, de 40 kd, compuesta por una sola subunidad conteniendo siete hélices α transmembranares, una región COOH-terminal en la cara citosólica de la membrana y un fragmento NH₂-terminal en la cara intradiscal. el cromóforo 11-cis-retinal está situado en un bolsillo de la proteína, próximo al centro de la membrana, con su eje longitudinal casi paralelo al plano de la membrana.

Sarcolema. Es la membrana celular de la fibra muscular, constituida por una membrana plasmática y una delgada capa de material polisacárido. También existen finas fibrillas de colágena en la capa externa del sarcolema.

Sarcoma. Del griego *Sarx*, carne y *oma*, tumor. Es un tumor maligno procedente de células conjuntivas. Por extensión se da este nombre también a los tumores malignos de los tejidos vascular, hematopoyético, muscular y nervioso.

Segundo mensajero. Se conoce también como mensajero o mediador intracelular, el cual actúa alterando el comportamiento de otras proteínas diana de la célula. Es una sustancia liberada dentro de la célula como recultado del enlace de un primer mensajero, una hormona u otro ligando, a un receptor situado en la superficie externa de la célula. El uso de segundos mensajeros permite a las células mostrar una respuesta coordinada a gran escala luego de la estimulación por un solo ligando extracelular.

Surfactante. Sustancia tensioactiva secretada por la membrana alveolar hacia los líquidos que revisten los alveolos. disminuye la tensión superficial de los alveolos de 3 a 5 veces. Esta sustancia evita el colapso alveolar.

Transfección. Inyección de material genético nuevo a una determinada línea celular.

Transgénico. Describe la introducción de DNA nuevo en la células germinales por su inyección en el núcleo del huevo.

Translocación. Proceso fisiológico mediante el cual diferentes macromoléculas pueden moverse de un lugar a otro en el interior celular. Esto puede ocurrir por la acción de enzimas denominadas translocasas, existencia de un gradiente electroquímico o la hidrólisis de ATP.

Tumor. Es una tumefacción ocasionada por el crecimiento persistente de tejido, de forma independiente de las estructuras circundantes y que no posee utilidad fisiológica.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldstein, A.; Aronow, L.; Kalman, S. M. Farmacología. Limusa. México, 1979. PP. 1, 2, 131-140.
2. Litter, M. Farmacología, 6ª. Edición, el Ateneo. Buenos Aires, Argentina, 1983. PP. 56, 62, 64, 70, 71.
3. Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Gilman, A. G. Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9a. Edición, McGraw-Hill Interamericana. México, D.F., 1996. PP. 31-33.
4. Bowman, W.C.; Rand, M.J. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas, 2a. Edición, Nueva Editorial Interamericana. México, D.F., 1985. PP. 39.1-39.14.
5. Kenakin, T. P.; Bond, R. A. and Bonner, T. I. II. *Definition of Pharmacological receptors*. Pharmacological Reviews 44(3):351-362, 1992.
6. Florez, J. Farmacología Humana, 2a. Edición, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Barcelona, España, 1992. P. 7.
7. Kenakin, T. *The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems*. Pharmacological Reviews 48(3):413-463, 1996.
8. Bylund, D. B.; Blaxall, H. S.; Iversen, L. J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. And Lomasney, J. W. *Pharmacological characteristics of α 2-adrenergic receptors: comparison of pharmacologically defined subtypes with subtypes identified by molecular cloning*. Molecular Pharmacology 42(1):1-5, 1992A
9. Gingrich, J. A. and Caron, M. G. *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. Annual Review of Neuroscience 16:299-321, 1993.
10. Humphrey, P.P.A. and Barnard, E.A. *International Union of Pharmacology. XIX. The IUPHAR receptor code: A proposal for an alphanumeric classification system*. Pharmacological Reviews 50(2):271-277, 1998.
11. Hollenberg, M. D. *Structure-activity relationships for transmembrane signaling: The receptor turn*. The FASEB Journal 5(2):178-186, 1991
12. Ferguson, S. S.G.; Zhang, J.; Barak, L. S. and Caron, M. G. *Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization*. Life Sciences 62(17/18):1561-1565, 1998.
13. Liggett, S. B.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. and Hnatowich, M. *Coupling of a mutated form of the human β_2 -adrenergic receptor to Gi and Gs*. The Journal of Biological Chemistry 266(8):4816-4821, 1991.
14. Hargrave, P. A. and McDowell, J. H. *Rhodopsin and phototransduction: A model system for G-protein-linked receptors*. The FASEB Journal 6:2323-2331, 1992.
15. Wess, J. *Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: Structural basis of ligand/receptor G protein interactions*. Life Sciences 53(19):1447-1463, 1993.
16. Brann, M. R.; Klimkowski, V. J. and Ellis, J. *Structure/Function relationships of muscarinic acetylcholine receptors*. Life Sciences 52(5/6):405-412, 1993.

17. Karp, G. Biología celular y molecular. McGraw-Hill interamericana editores, S.A. de C.V. México, D.F., 1998. PP. 125-129, 628, 635 y 636.
18. Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J.M. *International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors*. Pharmacological Reviews 50(2):279-290, 1998.
19. Zhong, H.; Minneman, K. P. *α_1 -adrenoceptor subtypes*. European Journal of Pharmacology 375(1/3):261-276, 1999.
20. García-Sainz, J. A.; Vázquez-Prado, J. and Villalobos-Molina, R. *α_1 -adrenoceptors: Subtypes, signaling and roles in health and disease*. Archives of Medical Research 30:449-458, 1999.
21. Dzimir, N. *Regulation of β -adrenoceptor signaling in cardiac function and disease*. Pharmacological Reviews 51 (3):465-501, 1999.
22. Sealfon, S. C. and Olanow, W. *Dopamine receptors: from structure to behavior*. Trends in Neurosciences 23(10):S34-S40, 2000
23. Nagatomo, T. and Koike, K. *Recent advances in structure, binding sites with ligands and pharmacological function of β -adrenoceptors obtained by molecular biology and molecular modeling*. Life Sciences 66(25):2419-2426, 2000.
24. Birnbaumer, L. *Transduction of receptor signal into modulation of effector activity by G proteins: The first 20 years or so...*The FASEB Journal 4(14):3178-3188, 1990.
25. Pennington, S. R. *GTP-binding proteins: heterotrimeric G proteins*. Protein Profile 1(3):169-225, 1994.
26. Neer, E. J. *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. Cell 80(2):249-257, 1995.
27. Wickman, K. D.; Iñiguez-Lluhi, J. A.; Davenport, P. A.; Taussing, R.; Krapivinsky, G. B.; Linder M. E.; Gilman, A. G. and Clapham, D. E. *Recombinant G-protein β -subunits activate the muscarinic-gated atrial potassium channel*. Nature 368(6468):255-257, 1994.
28. Camps, M.; Carozzi, A.; Schnabel, P.; Scheer, A.; Parker, P. J. and Gierschik, P. *Isozyme-selective stimulation of phospholipase C- β_2 by G protein β -subunits*. Nature 360(6405):684-686, 1992.
29. Katz, A.; Wu, D. and Simon, M. I. *Subunits β of heterotrimeric G protein activate β_2 isoform of phospholipase C*. Nature 360(6405):686-689, 1992.
30. Hazeki, O.; Okada, T.; Kurosuo, H.; Takasuga, S.; Suzuki, T.; Katada, T. *Activation of PI3-kinase by G protein β -subunits*. Life Sciences 62(17/18):1555-1559, 1998.
31. Gutkind, J. S.; Crespo, P.; Xu, N.; Teramoto, H. and Coso, O. A. *The pathway connecting m2 receptors to the nucleus involves small GTP-binding proteins acting on divergent MAP kinase cascades*. Life Sciences 60(13/14):999-1006, 1997.
32. Neubig, R. *Membrane organization in G-protein mechanisms*. The FASEB Journal 8(12):939-946, 1994.
33. Smith, C.A.; Wood, E. J. Biología Celular. Addison wesley Longman de México. México, 1998. PP. 213-215.

34. Clapham, D. E. And Neer, E. J. *New roles for G-protein β -dimers in transmembrane signaling.* Nature 365:403-406, 1993.
35. Taussig, R. and Gilman A. G. *Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.* The Journal of Biological Chemistry 270(1):1-4, 1995.
36. Rhee, S. G. and Choi, K. D. *Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase ϵ isozymes.* The Journal of Biological Chemistry 267(18):12393-12396, 1992.
37. Sharp, D. J.; White, D. L.; Chiou, X. G.; Goodson, T.; Gamboa, G. C.; McCluse, D.; Burgett, S.; Hoskins, J.; Skatrud, P. L.; Sportsman, J. R.; Becker, G. W.; Kang, L. H.; Roberts, E. F. And Kramer, R. M. *Molecular cloning and expression of human Ca^{2+} -sensitive cytosolic phospholipase A_2 .* The Journal of Biological Chemistry 266(23):14850-14853, 1991.
38. Van Biesen, T.; Luttrell, L. M.; Hawes, B. E. And Lefkowitz, R. J. *Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors.* Endocrine Reviews 17(6):698-714, 1996.
39. Teramoto, H.; Coso, O. A.; Miyata, H.; Igishi, T.; Miki, T. and Gutkind, S. *Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway.* The Journal of Biological Chemistry 271(44):27225-27228, 1996.
40. Roberson, E. D.; English, J. D.; Adams, J. P.; Selcher, J. C.; Kondratik, C.; Sweatt, J. D. *The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus.* The Journal of Neuroscience 19(11):4337-4348, 1999.
41. Schwinn, D. A.; Lomasney, J. W.; Lorenz, W.; Szklut, P. J.; Fremeau, R. T. Jr.; Yang-Feng, T. L.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. and Cotecchia, S. *Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtype.* The Journal of Biological Chemistry 265(14):8183-8189, 1990.
42. Perez, D. M.; Piascik, M. T. and Graham, R. M. *Accelerated communication. Solution phase library screening for the identification of rare clones: Isolation of an $\alpha 1D$ -adrenergic receptor cDNA.* Molecular Pharmacology 40(6):876-883, 1991.
43. Lomasney, J. W.; Cotecchia, S.; Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. *Minireview. Molecular biology of α -adrenergic receptors: Implications for receptor classification and for structure-function relationships.* Biochimica et Biophysica Acta 1095(2):127-139, 1991.
44. Bylund, D. B. *Subtypes of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenergic receptors.* The FASEB Journal 6:832-839, 1992B
45. Lomasney, J. W.; Lorenz, W.; Allen, L. F.; King, K.; Regan, J. W.; Yang-Feng, T. L.; Caron, M. G. and Lefkowitz R. J. *Expansion of the $\alpha 2$ -adrenergic receptor family: Cloning and characterization of a human $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtype, the gene for which is located on chromosome 2.* Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA 87(13):5094-5098, 1990.

46. Lanier, S. M.; Downing, S.; Duzic, E. and Homcy, C. J. *Isolation of rat genomic clones encoding subtypes of the α 2-adrenergic receptor*. The Journal of Biological Chemistry 266(16):10470-10478, 1991.
47. Simonneaux, V.; Ebadi, M. and Bylund, D. B. *Identification and characterization of α 2D-adrenergic receptors in bovine pineal gland*. Molecular Pharmacology 40(2):235-241, 1991.
48. Harrison, J. K.; D'Angelo, D. D.; Zeng, D. and Lynch, K. R. *Pharmacological characterization of rat α 2-adrenergic receptors*. Molecular Pharmacology 40(3):407-412, 1991.
49. Chang, D. J.; Chang, T. K.; Yamanishi, S. S.; Salazar F.H. R.; Kosaka, A. H.; Khare, R.; Bhakta, S.; Jasper, J. R.; Sieh, I. S.; Lesnick, J. D.; Ford, A. P.D.W.; Daniel S., Donald V.; Eglen, R. M.; Clarke, D. E.; Bach, C. and Chan, H. W. *Molecular cloning, genomic characterization and expression of novel human α 1A-adrenoceptor isoforms*. FEBS Letter 422(2):279-283, 1998.
50. Ruffolo, R. R. Jr.; Nichols, A. J. and Hieble, J. P. *Minireview. Metabolic regulation by α 1- and α 2-adrenoceptors*. Life Sciences 49(3):171-183, 1991.
51. Kukkonen, J.; Jansson, C. C. and Akerman, K. E. O. *Agonist trafficking of G_i/o -mediated α 2A adrenoceptor responses in HEL 92.1.7 cells*. British Journal of Pharmacology 132(7):1477-1484, 2001.
52. Lawhead, R. G.; Blaxall, H. S.; Bylund, D. B. *α 2A is the predominant α -2 adrenergic receptor subtype in human spinal cord*. Anesthesiology 77(5):983-991, 1992.
53. Hirasawa, A.; Awayi, T.; Xu, Z.; Shinoura, H.; Tsujimoto, G. *Regulation of subcellular localization of α 1-adrenoceptor subtypes*. Life Sciences 68 (19/20):2259-2267, 2001.
54. Raiteri, M.; Bonanno, G.; Mauiki, G.; Pende, M.; Andridi, G. C. and Ruelle, A. *Subclassification of release-regulating α 2-autoreceptors in human brain cortex*. British Journal of Pharmacology 107(4):1146-1151, 1992.
55. García-Sainz, J. A.; Vázquez-Prado, J.; Medina, L. C. *Review. α 1-Adrenoceptors: Function and phosphorylation*. European Journal of Pharmacology 389(1):1-12, 2000.
56. Cotecchia, S.; Kobilka, B. K.; Daniel, K. W.; Nolan, R. D.; Lapetina, E. Y.; Caron, M. G.; Leikowitz, R. J. and Regan, J. W. *Multiple second messenger pathways of α -adrenergic receptor subtypes expressed in eukaryotic cells*. The Journal of Biological Chemistry 265(1):63-69, 1990.
57. Scholz, J.; Troll, U.; Sandig, P.; Schmitz, W.; Scholz, H. and Schulte, A. E. J. *Existence and α 1-adrenergic stimulation of inositol polyphosphates in mammalian heart*. Molecular Pharmacology 42(1):134-140, 1992.

58. Bylund, D. B.; Eikenberg, D. C.; Hieble, J. P.; Langer, S. Z.; Lefkowitz, R. J.; Minneman, K. P.; Molinoff, P. B.; Ruffolo, R. R. and Trendelenburg, U. *IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of adrenoceptors*. *Pharmacological Reviews* 46(2):121-136, 1994.
59. Varma, D. R. and Deng, X. F. *Cardiovascular α_1 -adrenoceptor subtypes: Functions and signaling*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 78(4):267-292, 2000.
60. Theroux, T. L.; Esbenshade, T. A.; Peavy, R. D. and Minneman K. P. *Coupling efficiencies of human α_1 -adrenergic receptor subtypes: Titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors*. *Molecular Pharmacology* 50(5):1376-1387, 1996.
61. Gurdal, H.; Seasholtz, T. M.; Wang, H. Y.; Brown, R. D.; Johnson, M. D. and Friedman, E. *Role of G α_q or G α_o proteins in α_1 -adrenoceptor subtype-mediated responses in fischer 344 rat aorta*. *Molecular Pharmacology* 52(6):1064-1070, 1997.
62. Macrez-Leprêtre, N.; Kalkbrenner, F.; Schultz, G. and Mironneau, J. *Distinct functions of G α_q and G α_{11} proteins in coupling α_1 -adrenoceptors to Ca $^{2+}$ release and Ca $^{2+}$ entry in rat portal vein myocytes*. *The Journal of Biological Chemistry* 272(8):5261-5268, 1997.
63. Horie, K.; Itoh, H. and Tsujimoto, G. *Hamster α_1B -adrenergic receptor directly activates Gs in the transfected chinese hamster ovary cells*. *Molecular Pharmacology* 48(3):392-400, 1995.
64. Lin, R. Z.; Chen, J.; Hu, Z. W. and Hoffman, B. B. *Phosphorylation of the cAMP response element-binding protein and activation of transcription by α_1 -adrenergic receptors*. *The Journal of Biological Chemistry* 273(45):30033-30038, 1998.
65. Xing, M. and Insel P. *Protein kinase C-dependent activation of cytosolic phospholipase A $_2$ and mitogen-activated protein kinase by alpha $_1$ -adrenergic receptors in Madin-Darby canine kidney cells*. *The Journal of Clinical Investigation* 97(5):1302-1310, 1996.
66. Llahi, S. and Fain, J. N. *α_1 -adrenergic receptor-mediated activation of phospholipase D in rat cerebral cortex*. *The Journal of Biological Chemistry* 267(6):3679-3685, 1992.
67. Balboa, M. A. and Insel, P. A. *Stimulation of phospholipase D via α_1 -adrenergic receptors in Madin-Darby canine kidney cells is independent of PKC α and c activation*. *Molecular Pharmacology* 53(2):221-227, 1998.
68. Debetto, P.; Cargnelli, G.; Antolini, M.; Bova, S.; Trevisi, L.; Varotto, R. and Luciani, S. *α_1 -adrenoceptor-mediated formation of glycerophosphoinositol 4-phosphate in rat heart: Possible role in the positive inotropic response*. *Biochemical Pharmacology* 58(9):1437-1446, 1999.

69. Allen, L. F.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. and Cotecchia, S. *G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: Constitutively activating mutation of the $\alpha 1B$ -adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88(24):11354-11358, 1991.
70. Okazaki, M.; Hu, Z. W.; Fujinaga, M. and Hoffman, B. B. *Alpha, adrenergic receptor induced c-fos gene expression in rat aorta and cultured vascular smooth muscle cells*. The Journal of Clinical Investigation 94(1):210-218, 1994.
71. Xin, X.; Yang, N.; Eckhart, A. D. and Faber, J. E. *$\alpha 1D$ -adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle*. Molecular Pharmacology 51(5):764-775, 1997.
72. García-Saiz, J. A.; Alcántara-Hernández, R.; Vázquez-Prado, J. *$\alpha 1$ -adrenoceptors subtype activation increases proto-oncogene mRNA levels. Role of protein kinase C*. European Journal of Pharmacology 342(2/3):311-317, 1998.
73. Hu, Z. W.; Shi, X. Y.; Lin, R. Z. and Hoffman, B. B. *$\alpha 1$ -Adrenergic receptors activate phosphatidylinositol 3-kinase in human vascular smooth muscle cells. Role in mitogenesis*. The Journal of Biological Chemistry 271(15):8977-8982, 1996.
74. Duggan, J. A. and Tabrizchi, R. *Influence of T-type Ca^{2+} (mibefradil) and Cl^{-} (indanyloxyacetic acid 94)channel antagonists on $\alpha 1$ -adrenoceptor mediated contractions in rat aorta*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 78(9):714-720, 2000.
75. Ikesue, H.; Kataoka, Y.; Kawachi, R.; Dohgu, S.; Shuto, H.; Oishi, R. *Cyclosporine enhances $\alpha 1$ -adrenoceptor-mediated nitric oxide production in C6 glioma cells*. European Journal of Pharmacology 407(3):221-226, 2000.
76. Langing, D.; Portillo, M. P.; Saulnier-Blache, J. S. and Lafontan, M. *Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species*. European Journal of Pharmacology 199(3):291-301, 1991.
77. Oostendorp, J.; Preitner, F.; Moffatt, J.; Jimenez, M.; Giacobino, J. P.; Molenaar, P. and Kaumann, A. J. *Contribution of β -adrenoceptor subtypes to relaxation of colon and oesophagus and pacemaker activity of ureter in wild type and $\beta 3$ -adrenoceptor knockout mice*. British Journal of Pharmacology 130(4):747-758, 2000.
78. Sano, M.; Yoshimasa, T.; Yagura, T. and Yamamoto, I. *Non-homogeneous distribution of $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptors in various human tissues*. Life Sciences 52(12):1063-1070, 1993.
79. Nijkamp, F.P. *β -adrenergic receptors in the lung: An introduction*. Life Sciences 52(26):2073-2082, 1993.

80. Kaumann, A. J.; Preitner, F.; Sarsero, D.; Molenaar, P.; Revelli, J. P. and Giacobino, J. P. (-)CGP12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative β_4 -adrenoceptors in both wild-type and β_3 -adrenoceptor knockout mice. *Molecular Pharmacology* 53(4):670-675, 1998.
81. Collins, S. *Recent perspectives in the molecular structure and regulation of the β_2 -adrenoceptor*. *Life Sciences* 52(26):2083-2091, 1993.
82. Gauthier, C.; Tavernier, G. Viéve; Charpentier, F.; Langin, D. and Le Marec, H. *Functional β_3 -adrenoceptor in the human heart*. *The Journal of Clinical Investigation* 98(2):556-562, 1996.
83. Post, S. R.; Hammond, H. K. and Insel, P. A. *β -Adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39:343-360, 1999.
84. Levitzki, A.; Marbach, I. and Bar-Sinai, A. *The signal transduction between β -receptors and adenylyl cyclase*. *Life Sciences* 52(26):2093-2100, 1993.
85. Xiao, R. P.; Ji, X. and Lakatta, E. G. *Functional coupling of the β_2 -adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes*. *Molecular Pharmacology* 47(2):322-329, 1995.
86. Green, S. A.; Holt, B. D. and Liggett, S. B. *β_1 - and β_2 -adrenergic receptors display subtype-selective coupling to Gs*. *Molecular Pharmacology* 41(5):889-893, 1992.
87. Ostrom, R. S.; Violin, J. D.; Coleman, S. and Insel, P. A. *Selective enhancement of β -adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: Colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes*. *Molecular Pharmacology* 57(5):1075-1079, 2000.
88. Jordan, J.; Tank, J.; Stoffels, M.; Franke, G.; Christensen, N. J.; Luft, F. C. and Boschmann, M. *Interaction between β -adrenergic receptor stimulation and nitric oxide release on tissue perfusion and metabolism*. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86(6):2803-2810, 2001.
89. Lipskaia, L.; Defer, N.; Esposito, G.; Hajar, I.; Garel, M. C.; Rockman, H. A.; Hanoune, J. *Enhanced cardiac function in transgenic mice expressing a Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase*. *Circulation Research* 86(7):795-801, 2000.
90. Isohama, Y.; Kanemaru, M.; Kai, H.; Takahama, K.; Miyata, T. *Interaction between β -adrenergic signaling and protein kinase C increases cytoplasmic Ca^{2+} in alveolar type II cells*. *Life Sciences* 68(21):2361-2371, 2001.

91. Xiao, R. P.; Hohl, C.; Altschult, R.; Jones, L.; Livingston, B.; Ziman, B.; Tantini, B. and Lakatta, E. G. *β 2-adrenergic receptor-stimulated increase in cAMP in rat heart cells is not coupled to changes in Ca^{2+} dynamics, contractility, or phospholamban phosphorylation.* The Journal of Biological Chemistry 269(29):19151-19156, 1994.
92. Scornick, F. S.; Codina, J.; Birbaumer, L. and Toro, L. *Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by Gsa independent of phosphorylation by protein kinase A.* American Journal of Physiology 265(4Pt.2):H1460-H1465, 1993.
93. Wellman, G. C.; Quayle, J.M. and Standen, N.B. *ATP-sensitive K^+ channel activation by calcitonin gene-related peptide and protein kinase A in pig coronary arterial smooth muscle.* The Journal of Physiology 507(1):117-129, 1998.
94. Hudman, D.; Elliott, R. A.; Norman, R. I. *K_{ATP} channels mediated the β 2-adrenoceptor agonist-induced relaxation of rat detrusor muscle.* European Journal of Pharmacology 397(1): 169-176, 2000.
95. Pelzer, S.; You, Y.; Shuba, Y. M. and Pelzer, D. J. *β -adrenoceptor-coupled Gs protein facilitates the activation of cAMP-dependent cardiac Cf current.* American Journal of Physiology 273(6Pt.2):H2539-H2548, 1997.
96. Muyderman, H.; Sinclair, J.; Jardemark, K.; Hansson, E.; Nilsson, M. *Activation of β -adrenoceptors opens calcium-activated potassium channels in astroglial cells.* Neurochemistry International 38(3):269-276, 2001.
97. Barber, D. L. and Ganz, M. B. *Guanine nucleotides regulate β -adrenergic activation of Na/H exchange independently of receptor coupling to Gs.* The Journal of Biological Chemistry 267(29): 20607-20612, 1992.
98. Lagadic-Gossmann, D. and Vaughan-Jones, R.D. *Coupling of dual acid extrusion in the guinea pig isolated ventricular myocytes to α 1- and β -adrenoceptors.* Journal of Physiology 464 :49-73, 1993.
99. Hall, R. A.; Premont, R. T.; Chow, C. W.; Blitzer, J. T.; Pitcher, J. A.; Claing, A.; Stoffel, R. H.; Barak, L. S.; Schenolikar, S.; Weiman, E. J.; Grinstein, S.; Lefkowitz, R. J. *The β 2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange.* Nature 392:622-630, 1998.
100. Jiang, T. and Steinberg, S. F. *β 2-adrenergic receptors enhanced contractility by stimulating HCO_3^- -dependent intracellular alkalization.* American Journal of Physiology 273(2Pt.2):H1044-H1047, 1997.
101. Lindquist, J. M.; Fredriksson, J. M.; Rehnmark, S.; Cannon, B. and Nedergaard, J. *β 3- and α 1-adrenergic Erk 1/2 activation is Src-but not Gi-mediated in brown adipocytes.* The Journal of Biological Chemistry 273(30):22670-22677, 2000.

102. Gerhardt, C.C.; Gros, J.; Strosberg, A.D. and Issad, T. *Stimulation of the extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ pathway by human Beta-3 adrenergic receptor: New pharmacological profile and mechanism of activation.* Molecular Pharmacology 55(2):255-262, 1999.
103. Soeder, K. J.; Snedden, S. K.; Cao, W.; Della R., Gregory J.; Daniel, K. W.; Lutrell, L. M. and Collins, S. *The β_3 -adrenergic receptor activates mitogen-activated protein kinase in adipocytes through a G α -dependent mechanism.* The Journal of Biological Chemistry 274(17):12017-12022, 1999.
104. Gu, C.; Yong-Chao, M.; Benjamin, J.; Littman, D.; Chao, M. V. and Xin-Yun, H. *Apoptotic signaling through the β -adrenergic receptor.* The Journal of Biological Chemistry 275(27):20726-20733, 2000.
105. Chesley, A.; Lundberg, M. S.; Asai, T.; Rui-Ping, X.; Ohtani, S.; Lakatta, E. G.; Crow, M. T. *The β_2 -adrenergic receptor delivers and an the antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G α -dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase.* Circulation Research 87(12):1172-1179, 2000.
106. Felder, C. C. *Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors.* The FASEB Journal 9(8):619-625, 1995.
107. Hosey, M. M. *Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors.* The FASEB Journal 6:845-852, 1992.
108. Eglen, R. M.; Hegde, S. S. and Watson, N. *Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function.* Pharmacological Reviews 48(4):531-565, 1996.
109. Barnes, P. J. *Muscarinic receptor subtypes in airways.* Life Sciences 52(5/6):521-527, 1993.
110. Ehler, F. J.; Ostrom, R. S. and Sawyer, G. W. *Subtypes of the muscarinic receptor in smooth muscle.* Life Sciences 61(18):1729-1740, 1997.
111. Barnes, P. J. *Muscarinic receptors in airways: Recent developments.* Journal of Applied Physiology 68(5):1777-1785, 1990.
112. Ghodsi-Hovsepian, S.; Messe, W. S. Jr. and Hoss, W.. *Differential coupling between muscarinic receptors and G-proteins in regions of the rat brain.* Biochemical Pharmacology 39(8): 1385-1391, 1990.
113. Richards, M. H. *Pharmacology and second messenger interactions of cloned muscarinic receptors.* Biochemical Pharmacology 42(9):1645-1653, 1991.

114. Segal, M. and Auerbach, M. *Muscarinic receptors involved in hippocampal plasticity*. Life Sciences 60(13/14): 1085-1091, 1997.
115. Kotlikoff, M. I.; Dhulipala, P. and Yong-Xiao, W. *M₂ signaling in smooth muscle cells*. Life Sciences 64(6/7): 437-442, 1999.
116. Otto-Erich, B.; and Michel, M. *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart*. Pharmacological Reviews 51(4): 651-689, 1999.
117. Raiteri, M.; Marchi, M. and Paudice, P. *Presynaptic muscarinic receptors in the central nervous system*. Annals of the New York Academy of Science 604:113-129, 1990.
118. Kibinger, H.; Schneider, R.; Siefken, H.; Wolf, D. and D'Agostino, G. *Characterization of prejunctional muscarinic autoreceptors in the guinea-pig trachea*. British Journal of Pharmacology 103(3):1757-1763, 1991.
119. Hegde, S. S. and Eglon, R. M. *Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle contractility in the urinary bladder*. Life Sciences 64(6/7):419-428, 1999.
120. Wess, J.; Blin, N.; Mutschler, E. and Blüml, K. *Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling*. Life Sciences 56(11/12):915-922, 1995.
121. Jones, S. V. P. *Muscarinic receptor subtypes: modulation of ion channels*. Life Sciences 52(5/6): 457-464, 1993.
122. Nan-Xing, Q.; Russell, M. and Johnson, G. L. *Acetylcholine muscarinic receptor regulation of the Ras/Raf/MAP kinase pathway*. Life Sciences 56(11/12): 945-949, 1995.
123. Esqueda, E. E.; Gerstin, E. H. Jr.; Griffin, M. T. and Ehler, F. J. *Stimulation of cyclic AMP accumulation and phosphoinositide hydrolysis by M₃ muscarinic receptors in the rat peripheral lung*. Biochemical Pharmacology 52(4): 643-658, 1996.
124. Koppen, C. J.; Meyer, Z. H. D.; Alemany, R.; Jakobs, K. H. *Sphingosine kinase-mediated calcium signaling by muscarinic acetylcholine receptors*. Life Sciences 68(22/23): 2535-2540, 2001.
125. Sandman, J.; Peralta, E. G. and Wurtman, R. J. *Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to phospholipase D*. The Journal of Biological Chemistry 266(10): 6031-6034, 1991.
126. Xiao-Bing, W.; Osugi, T. and Shuji, U. *Muscarinic receptors stimulated Ca²⁺ influx via phospholipase A₂ pathway in ileal smooth muscle*. Biochemical and Biophysica Research Communication 193(2): 483-489, 1993.

127. Hille, B.; Beech, D.J.; Bernheim, L.; Mathie, A.; Shapiro, M.S.; Wollmuth, L.P. *Multiple G-protein-coupled pathways inhibit N-type Ca channels of neurons*. Life Sciences 56(11/12): 989-992, 1995.
128. Brown, D.A.; Abogadie, F.C.; Allen, T.G.J.; Buckley, N.J.; Caulfield, M.P.; Delmas P.; Haley, J.E.; Lamas, J.A. and Selyanco, A.A. *Muscarinic mechanisms in nerve cells*. Life Sciences 60(13/14): 1137-1144, 1997.
129. Reuveny, E.; Slesinger, P. A., Inglese, J.; Morales, J. M.; Iñiguez-Lluhi, J. A.; Leftkowitz, R. J.; Bourne, H. R.; Jan, Y. N. and Jan, L. Y. *Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein β subunits*. Nature 370: 143-146, 1994.
130. Winding, B. and Bindsley, N. *Characterization of a muscarinic receptor controlling Cf secretion in hen trachea*. American Journal of Physiology 258(6Pt.1): C982-C987, 1990.
131. Eglen, R. M. *Muscarinic receptors and gastrointestinal tract smooth muscle function*. Life Sciences 68(22/23): 2573-2578, 2001.
132. Post, G. R. and Brown, J. H. *G protein-coupled receptors and signaling pathways regulating growth responses*. The FASEB Journal 10(7): 741-749, 1996.
133. Togashi, H.; Emala, C. W.; Hall, I. P. and Hirshman, C. A. *Charbachol induced actin reorganization involves Gi activation of Rho in human airway smooth muscle cells*. American Journal of Physiology 274(18): L803-L809, 1998.
134. Bussey, H. *Cell shape determination: a pivotal role for Rho*. Science 272(5259): 224-225, 1996.
135. Linseman, D. A.; Heidenreich, K. A. and Fisher, S. K. *Stimulation of M₃ muscarinic receptors induces phosphorylation of the Cdc42 effector activated Cdc42HS-associated kinase-1 via a Fyn tyrosine kinase signaling pathway*. The Journal of Biological Chemistry 276(8): 5622-5628, 2001.
136. D'Agostino, G.; Barbieri, A.; Grana, E. and Subissi, A. *Characterization of prejunctional muscarinic autoreceptors in the rat urinary bladder*. Life Sciences 52(5/8): 580, 1993.
137. Kilbinger, H.; Von, Bardeleben, R. S.; Siefken, H.; Wolf, D. *Prejunctional muscarinic receptors regulating neurotransmitter release in airways*. Life Sciences 56(11/12): 981-987, 1995.
138. Alberts, P. *Classification of the presynaptic muscarinic receptor subtype that regulates H³-acetylcholine secretion in the guinea pig urinary bladder in vitro*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 274(1): 458-468, 1995.
139. Braverman, A. S.; Kohn, I. J.; Luthin, G. R. and Ruggieri, M. R. *Prejunctional M₁ facilitatory and M₂ inhibitory muscarinic receptors mediate rat bladder contractility*. American Journal of Physiology 274(2Pt.2): R517-R523, 1998.

140. Somogyi, G. T. and De Groat, W. C. *Function, signal transduction mechanisms and plasticity of presynaptic muscarinic receptors in the urinary bladder*. Life Sciences 64 (6/7): 411-418, 1999.
141. Jaber, M.; Robinson, S. W.; Missale, C. and Caron, M. G. *Dopamine receptors and brain function*. Neuropharmacology 35(11):1503-1519, 1996.
142. Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M. and Caron, M. G. *Dopamine receptors: From structure to function*. Physiological Reviews 78(1):189-226, 1998.
143. Vallone, D.; Picetti, R.; Borrelli, E. *Structure and function of dopamine receptors*. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24(1):125-132, 2000.
144. Sibley, D. R. and Monsma, F. J. Jr. *Molecular biology of dopamine receptors*. Trends in Pharmacological Sciences 13(2):61-69, 1992.
145. Strange, P. G. *New insights into dopamine receptors in the central nervous system*. Neurochemistry International 22(3):223-236, 1993.
146. Lachowicz, J. E. and Sibley, D. R. *Molecular characteristics of mammalian dopamine receptors*. Pharmacology and Toxicology 81(3):105-113, 1997.
147. Strange, P. G. *Aspects of the structure of the D₂ dopamine receptor*. Trends in Neurosciences 13(9):373-378, 1990.
148. Civelli, O.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K.; Qun-Yong, Z. and Van Tol, H. H. M. *Molecular biology of the dopamine receptors*. European Journal of Pharmacology 207(4):277-286, 1991.
149. Goldstein, M.; Harada, K.; Meller, E.; Sehaling, M. and Hokfelt, T. *Dopamine autoreceptors. Biochemical, pharmacological and morphological studies*. Annals of the New York Academy of Sciences 604:169-175, 1990.
150. De Keyser, J. *Subtypes localization of dopamine receptors in human brain*. Neurochemistry International 22(2):83-93, 1993.
151. Shafer, R. A.; Levant, B. *The D₃ dopamine receptor in cellular and organismal function*. Psychopharmacology 135(1):1-16, 1998.
152. Andersen, P. H.; Gingrich, J. A.; Bates, M. D.; Dearry, A.; Falardeau, P.; Senogles, S. E. and Caron, M. G. *Dopamine receptor subtypes: Beyond the D₁/D₂ classification*. Trends in Pharmacological Sciences 11(6):231-236, 1990.

153. Felder, R.A.; Eisner, G.M. and Jose, P. A. D. *dopamine receptor signaling defect in spontaneous hypertension*. *Acta Physiologica Scandinavica* 168(1):245-250, 2000.
154. Lokhandwala, M. F. and Amenta, F. *Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney*. *The FASEB Journal* 5(15):3023-3030, 1991.
155. O'Connell, D.P. *Expression of newly cloned brain dopamine receptors in peripheral organs*. *Biochemical Society Transactions* 24(1):169-172, 1996.
156. Sidhu, A.; Niznik, H. B. *Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins*. *International Journal of Development Neuroscience* 18(7):669-677, 2000.
157. Jiang, M.; Spicher, K.; Boulay, G.; Wang, Y. and Birnbaumer, L. *Most central nervous system D₂ dopamine receptors are coupled to their effectors by Go*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98(6):3577-3582, 2001.
158. Li, L. and Schafer, J. A. *Dopamine inhibits vasopressin-dependent cAMP production in the rat cortical collecting duct*. *American Journal of Physiology* 275(1Pt.2):F62-F67, 1998.
159. Civelli, O.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K. *Molecular diversity of the dopamine receptors*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33:281-307, 1993.
160. Hernández-López, S.; Tkatch, T.; Pérez-Garci, E.; Galarraga, E.; Bargas, J.; Hamm, H. and Surmeier, D. J. *D₂ dopamine receptors in striatal medium spini neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLCβ1-IP3-calcineurin-signaling cascade*. *The Journal of Neuroscience* 15(24):8987-8995, 2000.
161. Castellano, M. A.; Li-Xin, L.; Monsma, F. J.; Sibley, D. R.; Kapatos, G. and Chiodo, L. A. *Transfected D₂ short dopamine receptors inhibit voltage-dependent potassium current in neuroblastoma x glioma hybrid (NG108-15) cells*. *Molecular Pharmacology* 44(3):649-656, 1993.
162. Ohbu, K.; Felder, R. A. *DA₁ dopamine receptors in renal cortical collecting duct*. *American Journal of Physiology* 261 (5):F890-F895, 1991.
163. Oak, J. N.; Oldenhof, J.; Van Tol, H. H. M. *The dopamine D₄ receptor: One decade of research*. *European Journal of Pharmacology* 405:303-327, 2000.
164. Felder, C. C.; Campbell, T.; Albrecht, F. and José, P. A. *Dopamine inhibits Na⁺ - H⁺ exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylyl cyclase*. *American Journal of Physiology* 259(2Pt.2):F297-F303, 1990.

165. Ganz, M. B.; Fachter J. A. and Barber, D. L. *Multiple receptors coupled to adenylyate cyclase regulate Na-H exchange independent of cAMP.* The Journal of Biological Chemistry 265(16):8989-8992, 1990.
166. Senogles, S. E. *The D₂₅ dopamine receptor stimulates phospholipase D activity: A novel signaling pathway for dopamine.* Molecular Pharmacology 58(2):455-462, 2000.
167. Griffon, N.; Sautel, F.; Pilon, C.; Lèvesque D.; Sokoloff, P.; Schwartz, J.C.; Diaz, J.; Simon, P.; Costentin, J.; Mann, A. and Wermuth, C.G. *Functional models for the dopamine D₃ receptor.* Biochemical Society Transactions 24(1):193-198, 1996.
168. Cai, G.; Zhen, X.; Uryu, K. and Friedman E. *Activation of Extracellular signal-regulated protein kinases is associated with a sensitized locomotor response to D₂ dopamine receptor stimulation in unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats.* The Journal of Neuroscience 20(59):1849-1857, 2000.