

149  
241

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

MODULACION HORMONAL DE LA  
ACTIVIDAD DE FOSFORILASA a EN  
HEPATOCITOS DE CUYO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
JESUS ALBERTO OLIVARES REYES

FALLA DE ORIGEN



México, D. F.

1991



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 está 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.

## RESUMEN

Uno de los modelos más estudiados para comprender la regulación de las funciones metabólicas por acción hormonal es el hígado de rata. Estudios previos demuestran que estas funciones se regulan, principalmente, por dos mecanismos de acción hormonal: el de la Adenilato Ciclasa y el de los Fosfoinosítidos-Calcio. Entre los agentes que se acoplan al primer mecanismo se encuentran la epinefrina (a través de receptores  $\beta$ , adrenérgicos) y el glucagon. En contraste, la vasopresina, la angiotensina II y la epinefrina (a través de la acción  $\alpha_1$  adrenérgica), se acoplan al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.

Un gran número de trabajos han reportado que la acción de todos estos agentes, en células hepáticas, puede diferir en cuanto a su sensibilidad y efectividad para activar rutas metabólicas específicas como son la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis, cuando se prueban en condiciones distintas como lo son el sexo, la edad, la especie y estados patológicos.

Por otra parte recientemente se propuso que la histamina también puede activar estas rutas metabólicas ejerciendo sus efectos a través de un receptor  $H_1$ , acoplado estimulatoriamente al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.

Estos antecedentes y otros estudios que proponen la existencia de tipos y subtipos de receptores desconocidos para algunos agentes como la epinefrina y la angiotensina, permitieron el estudio de la acción de tres compuestos: los agentes  $\alpha_1$  adrenérgicos, la histamina y la angiotensina II, en un modelo hepático distinto al de rata y estudiar si la acción de estos agentes pudiera diferir de manera significativa en cuanto a los tipos y subtipos de receptores que median sus acciones, al sistema de transducción implicado o a la ruta metabólica activada. Así se inició el presente proyecto estudiando la activación de la glucogenólisis en hepatocitos de cuyo macho.

Esta tesis se inicia con una introducción sobre la acción hormonal, indicando los estudios más importantes desarrollados hasta el momento para comprender estos mecanismos. Se hace énfasis en tres temas principales: el sistema de los fosfoinosítidos-calcio, los mecanismos de acción de los agentes a estudiar (compuestos  $\alpha_1$  adrenérgicos, histamina y angiotensina II), y la regulación de la glucogenólisis hepática.

Los resultados obtenidos indican que:

- a) La epinefrina, la norepinefrina, la histamina y la angiotensina II estimulan la glucogenólisis a través de los subtipos de receptores  $\alpha_{1a}$ ,  $H_1$  y  $AT_1$ , respectivamente, acoplados todos ellos, estimulatoriamente, al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.
- b) El incremento en la concentración intracelular de calcio por la movilización de este ión de reservorios internos (acción mediada por el  $IP_3$ ), activa a la fosforilasa  $a$ , enzima encargada de la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato.
- c) Se demuestra, por vez primera en este modelo, que la

histamina actúa sobre el metabolismo hepático a través del subtipo de receptor  $H_1$ .

d) La respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica muestra claras diferencias en comparación a lo reportado para el modelo hepático de rata.

e) La respuesta a la angiotensina II, también presenta diferencias, principalmente en cuanto a la sensibilidad para el TPA.

Todos estos resultados demuestran que el modelo hepático de cuyo difiere al modelo de rata, diferencias debidas, probablemente, a características propias de este sistema celular.

**TABLA DE ABREVIATURAS.**

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\alpha_i$	Subunidad alfa de la proteína G inhibitoria acoplada a la adenilato ciclasa.
$\alpha_s$	Subunidad alfa de la proteína G estimuladora acoplada a la adenilato ciclasa.
$\alpha_1$	Receptor adrenérgico acoplado estimulatoriamente al sistema de fosfoinosítidos-calcio.
$\alpha_2$	Receptor adrenérgico acoplado inhibitoriamente al sistema de la adenilato-ciclasa.
ADN	Acido desoxirribonucléico
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	AMP cíclico (adenosina-3-5-monofosfato)
AT <sub>1</sub>	Receptor a angiotensina II acoplado al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.
AT <sub>2</sub>	Receptor a angiotensina II
ATP	Adenosín trifosfato
CEC	Cloroetilclonidina

GDP	Guanosín difosfato
G <sub>i</sub>	Proteína G asociada inhibitoriamente a la adenilato ciclasa.
GTP	Guanosín trifosfato
GMP	Guanosín monofosfato
G <sub>p</sub>	Proteína G que se acopla estimulatoriamente al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.
G <sub>s</sub>	Proteína G que se acopla estimulatoriamente al sistema de la adenilato ciclasa.
H <sub>1</sub>	Receptor a histamina acoplado al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.
H <sub>2</sub>	Receptor a histamina que se acopla estimulatoriamente al sistema de la adenilato ciclasa.
H <sub>3</sub>	Receptor a histamina
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
KDa	Kilodaltones
KRB	Buffer Krebs-Ringer bicarbonato
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol-4-fosfato
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4-5-bifosfato
PKC	Proteín cinasa c
PLC	Enzima fosfolipasa c
TPA	Forbol-12-miristato-13-acetato
5-MU	5-Metil urapidil

	PAG
I INTRODUCCION -----	1
1. Generalidades -----	1
2. Mensajeros Químicos -----	3
3. Receptores -----	6
4. Mecanismos de Acción Hormonal -----	8
4.1 Sistema de Transducción de la Adenilato-Ciclase ----	10
4.2 Sistema de Transducción de Fosfoinosítidos-Calcio --	15
4.3 Acción de Agentes Adrenérgicos -----	22
4.4 Acción de Agentes Histaminérgicos -----	28
4.5 Acción de Angiotensina II -----	30
5. Regulación Hormonal del Metabolismo Hepático:	
Glucogenólisis-----	31
II ANTECEDENTES -----	36
III OBJETIVOS -----	40
IV MATERIALES Y METODOS -----	41
V RESULTADOS -----	44
VI DISCUSION -----	51
VII CONCLUSIONES -----	59
VIII BIBLIOGRAFIA -----	60

## I. INTRODUCCION.

### 1. GENERALIDADES.

La capacidad de comunicarse constituye una de las características fundamentales de los seres vivos. Gracias a ello todo organismo puede mantener un intercambio de información con su medio, que le permite percibir los cambios en las condiciones ambientales.

La transmisión de información a nivel celular, se lleva a cabo gracias a la existencia de sistemas de comunicación que permiten coordinar la adaptación de las diferentes funciones del organismo en respuesta a las variaciones del medio. La importancia de este fenómeno es tal, que la aparición de los sistemas de comunicación se remonta, probablemente, a los primeros sistemas celulares; ésto los capacitó para poder detectar estímulos externos (físicos o químicos), y regular y ajustar, como consecuencia de ello, sus funciones metabólicas en desarrollo. Fue a lo largo del proceso evolutivo como se conservaron los elementos esenciales de aquellos sistemas de comunicación que confieren una mayor cantidad de ventajas a las diferentes especies.

La forma de intercambio de información más primitiva, y actualmente una de las más importantes y ampliamente distribuidas entre los seres vivos, es la comunicación química. Este tipo de comunicación envuelve a un complejo aparato de comunicación intercelular basado en mensajeros químicos. Los mecanismos básicos implicados en la señalización química han variado muy



poco a lo largo del proceso evolutivo. Así en los organismos unicelulares, este tipo de comunicación les permite responder a los cambios químicos de su ambiente. Un ejemplo bien conocido es la respuesta quimiotáctil bacteriana, en la que el movimiento celular se orienta hacia una señal química determinada, o en dirección opuesta a ella (1, 2).

En los seres pluricelulares esta situación resultó mucho más compleja. La división de trabajo entre sus células tuvo como resultado la formación de tejidos específicos y de órganos, cada uno de los cuales con una función particular. Para ello fue necesario la presencia de sistemas de comunicación interna que coordinaran y regularan las actividades de los varios tipos celulares que conforman al organismo. El contacto físico directo entre células vecinas, a través de uniones celulares, constituyó una forma de regular sus funciones. Sin embargo, la comunicación entre células situadas a cierta distancia requirió un sistema de señales, basado en mensajeros químicos (1, 2).

Este tipo de comunicación es indispensable para coordinar la diversidad funcional de los cientos de tipos celulares que forman al organismo, y es posible gracias a la existencia de un medio interno, con el cual están en contacto todas sus células.

Los organismos pluricelulares cuentan con dos grandes sistemas de comunicación intercelular: el sistema nervioso y el sistema endócrino. Ambos están altamente especializados en la señalización química, y actúan conjuntamente coordinando las actividades de los distintos tipos celulares.

En el sistema nervioso, las neuronas transmiten la

información con mucha mayor rapidez que las células endócrinas ya que tienen la propiedad de generar impulsos eléctricos los cuales se propagan a gran velocidad a lo largo de las prolongaciones nerviosas. Los impulsos eléctricos se transforman en señales químicas cuando la información pasa de una neurona a la siguiente. Por el contrario, en el sistema endócrino un grupo de células elaboran mensajeros específicos, los cuales, son transportados por el torrente sanguíneo y actúan sobre células, tejidos y órganos, que en ocasiones se encuentran muy alejados de su lugar de origen. Sin embargo, a pesar de las diferencias funcionales entre estos dos sistemas, pueden considerarse a ambos como componentes del principal sistema comunicador de los organismos pluricelulares: el sistema neuroendócrino. Juntos pueden integrar de una forma coordinada la entrada de estímulos, así como las respuestas del organismo a cambios en su ambiente interno y externo (3, 4).

## **2. MENSAJEROS QUIMICOS.**

Los mensajeros químicos se caracterizan por ejercer su efecto sólo sobre aquellas células que poseen sistemas de recepción adecuados, que las capacita para percibir el mensaje y responder mediante la activación de una ruta de transmisión que es capaz de regular procesos celulares como la contracción muscular, el metabolismo, la secreción y el crecimiento (5).

Para lograr comprender como actúan los mensajeros químicos se han establecido diversos criterios que permiten identificar las diferentes estrategias de la señalización química.

El primero, se basa en la distancia que deben recorrer los

mensajeros para llegar a la célula blanco, donde ejercerán su acción. Así, las sustancias liberadas por una célula o por un grupo de células secretoras, pueden tener su acción sobre ellas mismas (acción autócrina), o sobre células cercanas (acción parácrina). En éste último caso, el mensajero es conocido como autocoide y se caracteriza por tener un efecto puramente local.

Cuando el mensajero es secretado a través de estructuras especializadas, conocidas como sinapsis, se denomina neurotransmisión, y al mensajero químico neurotransmisor.

A pesar de que estos tres tipos de comunicación se ejercen a corta distancia, uno de los más importantes y difundidos es el que se realiza a larga distancia (acción endócrina). En este caso el mensajero químico, conocido como hormona, se produce por una glándula de secreción interna y es liberado al torrente sanguíneo, por el que recorre grandes distancias para interactuar, finalmente, con las células blanco (3, 4).

Otro de los criterios para estudiar a los mensajeros, se basa en su naturaleza química, y por ello se establecen tres grandes categorías:

a) La primera de éstas, es la de los compuestos de tipo lipídico que incluye a las hormonas esteroideas y las prostaglandinas.

Las hormonas esteroideas, tales como estrógenos, progesterona y glucocorticoides, son sintetizadas por enzimas del retículo endoplasmático liso, que utilizan como precursor al colesterol.

La glándula adrenal y las gónadas, son los sitios principales de síntesis de estas hormonas y sus efectos primarios

se dan sobre la expresión genética.

Por su parte, las prostaglandinas, son compuestos derivados del araquidonato. Constituyen un importante ejemplo de mediadores químicos locales y entre sus efectos principales se encuentran: la inhibición de la lipólisis, la agregación de las plaquetas, la inflamación, el control del transporte iónico a través de las membranas y la modulación de la transmisión sináptica (3, 6).

b) La segunda categoría incluye a las hormonas peptídicas, que agrupa a los polipéptidos y proteínas; son sintetizadas por una gran variedad de glándulas endócrinas y presentan un sin número de efectos en la mayoría de las células del organismo.

c) Las aminas, que incluyen a los aminoácidos con funciones de mensajeros (glicina, ácido glutámico y aspártico), y a los derivados del metabolismo de los aminoácidos (como las catecolaminas, las hormonas tiroideas y la histamina), componen la tercera categoría de mensajeros químicos.

La mayoría de los aminoácidos, en el sistema nervioso, tienen como efecto principal el de actuar como neurotransmisores excitadores o inhibidores y son liberados por las terminaciones de las células nerviosas (2, 3).

La forma en que estos mensajeros ejercen su acción sobre la o las células blanco, es posible gracias a la existencia de dos mecanismos principales: Uno es el que llevan a cabo los mensajeros cuya naturaleza química es hidrofóbica, entre los que se encuentran las hormonas esteroideas y las tiroideas. Para ello, se unen a proteínas transportadoras específicas, que permiten su paso a través del torrente sanguíneo hasta la célula

blanco. Una vez en ella, atraviesan fácilmente la membrana plasmática, uniéndose a receptores protéicos específicos del citoplasma. El complejo formado (hormona-receptor), migra entonces hasta el núcleo de la célula y se une a puntos determinados del ADN, donde actúan como intensificadores de la transcripción, y permiten la expresión de genes específicos (6).

Por otra parte, las moléculas mensajeras de carácter hidrofílico, que incluyen a todos los neurotransmisores y a la gran mayoría de las hormonas peptídicas, catecolaminas y mediadores químicos locales, se unen a proteínas receptoras específicas, situadas en la superficie celular, dada su incapacidad de penetrar a través de la bicapa lipídica.

La interacción entre la hormona y el receptor activa una ruta de transmisión que transduce las señales externas en otras internas, que en última instancia, se encargan de regular diversos procesos celulares (4, 7).

### 3. RECEPTORES.

Como se mencionó, las dos formas en que actúan los mensajeros químicos requieren de la existencia de proteínas receptoras que estén asociadas a la membrana plasmática o libres en el citoplasma.

A partir de esta sección sólo se tratará de aquellos receptores que se encuentran en la membrana plasmática.

Los estudios pioneros que propusieron la existencia de sitios específicos de unión para los mensajeros químicos, fueron los realizados, en forma independiente, por Langley (1906) y Ehrlich (1910) (citado en 7, 71).

Ambos analizaron, con modelos celulares adecuados, la acción de compuestos antagónicos que competían mutuamente por ejercer sus efectos. Así surgió la idea de la existencia de un "sitio de unión", que jugaba un papel muy importante en el reconocimiento del mensajero químico y en la activación de la respuesta fisiológica (8).

La falta de técnicas experimentales que permitieran demostrar la existencia real de estos "sitios de unión", retardó por casi 60 años su descubrimiento.

Gracias a la utilización de ligandos marcados radiactivamente, se demostró la presencia de receptores específicos en la superficie de células intactas y de membranas aisladas.

En los últimos 10 años, los estudios en esta área permitieron comprender muchas de las propiedades fisicoquímicas (como son sus pesos moleculares y sus parámetros hidrodinámicos), químicas (subunidades componentes y sus secuencias de aminoácidos) y farmacológicas (identificación de subtipos de receptores en función de agonistas y antagonistas), de una gran cantidad de receptores como los adrenérgicos (9, 10), los histaminérgicos (11) y el receptor a insulina (12), entre otros.

Con todos estos estudios, actualmente se sabe que:

- A) La cantidad de receptores para un mensajero determinado, por célula, es limitada.
- B) El mensajero se une con alta afinidad y selectividad al receptor.
- C) La unión entre la hormona y su receptor es generalmente rápida y reversible.

D) El receptor no es un elemento estático anclado a la membrana celular, sino, por el contrario, es un elemento dinámico que tiene un papel muy importante en el paso de información, contenida en los mensajeros celulares, a través de los sistemas de transducción existentes.

E) La interacción de una hormona con su receptor induce una respuesta fisiológica apropiada en la célula blanco, la magnitud de la cual está directamente relacionada a la cantidad de hormona y de receptores (2).

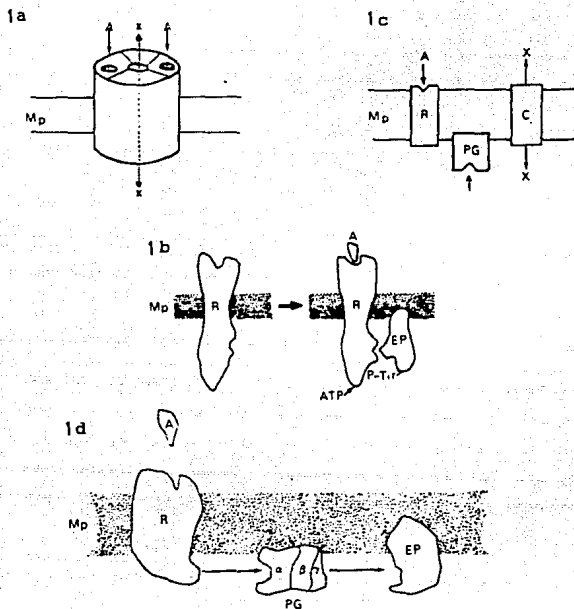
#### 4. MECANISMOS DE ACCION HORMONAL.

La regulación de las funciones celulares por mensajeros hidrofílicos requiere de mecanismos eficientes para que la señal pueda ser interpretada y reconocida en el interior de la célula.

La caracterización estructural de los receptores membranales ha permitido distinguir cuatro tipos principales de mecanismos de acción, a los cuales pueden estar acoplados para transmitir la señal (8,13).

I. En el primero, el receptor, al ser activado por la unión del mensajero (generalmente neurotransmisores), media el paso de iones específicos a través de la membrana, ya que son proteínas oligoméricas transmembranales, que además de contener los sitios de unión para la hormona, por si mismos constituyen un canal iónico. No existen evidencias de que su activación requiera de proteínas G y segundos mensajeros (esquema 1a).

II. El segundo mecanismo incluye a aquellos receptores que presentan actividad de proteína cinasa, con un dominio



## ESQUEMA 1

Modelos sobre los mecanismos de acción hormonal: 1a) La unión del mensajero regula la actividad de canales iónicos. El receptor, por sí mismo, contiene el sitio de unión para el agonista y es, además un canal iónico. 1b) El receptor al ser activado por el agonista presenta actividad de tirosina-cinasa, fosforilando a efectores protéicos específicos. 1c) El mensajero al unirse a su receptor, regula la actividad de canales iónicos a través de una proteína G. 1d) El mensajero se une a receptores acoplados a un sistema de transducción transmembranal que transmite la información al interior celular. A, agonista; X, iones específicos; Mp, membrana plasmática; R, receptor; PG, proteína G; tirosina-cinasa; C, canal iónico; EP, efector protéico; ATP, adenosín trifosfato;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , subunidades de la PG.



catalítico situado en la porción intracelular. El hecho de que el propio receptor tenga una actividad de cinasa, hace suponer que no exista un segundo mensajero, sino que él mismo, al ser activado por el mensajero, inicie la propagación de la señal al activar una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones. Ejemplo de este tipo de receptores es el de la insulina, ver esquema 1b (12).

III. Un tercer mecanismo es el que desencadenan algunos neurotransmisores, como la acetil colina, el GABA, la serotonina y adenosina. Estos mensajeros, al unirse a sus receptores específicos, regulan la actividad de canales iónicos a través de una proteína G, que actúa como un elemento transductor en el mecanismo. En este mecanismo, el receptor y el canal iónico son estructuras protéicas distintas, ver esquema 1c (13, 126).

IV. La gran mayoría de los mensajeros de tipo hidrofílico, como son las hormonas peptídicas, catecolaminas, mediadores, químicos locales y algunos neurotransmisores, se unen a receptores acoplados a un complejo sistema de señalización transmembranal que transmite la información desde el receptor activado, hasta un sistema efector final (esquema 1d).

Así, en este último mecanismo, la transmisión del mensaje implica la interacción específica de tres componentes distintos e integrales de la membrana:

- A) Un receptor que posee un sitio de unión específico para un ligando extracelular particular.
- B) Una proteína reguladora, conocida como proteína G, localizada en la superficie interna de la membrana que se encarga del acoplamiento del receptor con la enzima amplificadora,

que requiere para su funcionamiento nucleótidos de guanina (1, 8).

C) Una enzima amplificadora, localizada en la membrana celular, que cataliza la reacción por la cual se forma un mensajero intracelular o segundo mensajero.

El papel principal de estos segundos mensajeros es el de activar a proteínas cinasas, cuya función es la de fosforilar a proteínas específicas del interior de la célula. La modificación de una proteína por el enlace covalente con un grupo fosfato, tiene un efecto importante sobre sus propiedades cinéticas.

El mecanismo de acción de este sistema es básicamente el siguiente y será tratado con mayor detalle posteriormente.

La interacción de la molécula mensaje con el receptor induce un cambio conformacional en este último, que le permite interaccionar directamente con la proteína G. Esta, a su vez, activa a una enzima amplificadora que se encarga de generar un segundo mensajero. La generación del segundo mensajero provoca que la señal se propague y amplifique rápidamente por toda la célula (1).

#### 4.1 SISTEMA DE TRANSDUCCION DE LA ADENILATO CICLASA.

Hasta ahora se ha visto la forma en que los receptores están acoplados a diferentes mecanismos para que la señal hormonal pueda ser reconocida e interpretada en el interior celular.

En el último mecanismo descrito, después de unirse la hormona al receptor de la membrana plasmática, este complejo se acopla a un sistema de transducción específico.

Dos son los sistemas de transducción mejor estudiados

durante los últimos años: el de la "Adenilato Ciclasa" y el de los "Fosfoinositidos-Calcio".

El primer sistema en ser definido fue el de la adenilato ciclasa, gracias a los trabajos realizados por Sutherland y Rall (14), a finales de los años cincuenta, cuando estudiaban la acción de la adrenalina y el glucagon sobre la transformación del glucógeno en glucosa en células hepáticas.

La acción de estas hormonas, inducía un aumento en la actividad de la enzima glucógeno fosforilasa, encargada de promover el rompimiento de glucógeno en glucosa-1-fosfato. La utilización de fósforo marcado, les permitió saber que la glucógeno fosforilasa se regulaba bajo acción hormonal por fosforilaciones y desfosforilaciones. Con experimentos de fraccionamiento celular demostraron la existencia de una sustancia activadora de la enzima glucógeno fosforilasa, la cual se generaba al interaccionar la hormona con su receptor.

El análisis químico de este compuesto, por Sutherland (15) y Lipkin (6), demostró que se trataba de un derivado del AMP: la adenosina-3-5-monofosfato o AMP cíclico (AMPC).

Los estudios realizados por estos investigadores demostraron, además, que el AMPC era sintetizado a partir de ATP por acción de la enzima adenilato ciclasa, localizada en la membrana plasmática, y que el aumento en la actividad de la enzima se daba cuando la hormona se unía al receptor.

El trabajo realizado por Sutherland dió lugar al concepto de que el AMPC resultaba ser un segundo mensajero que transmitía las señal de una gran variedad de hormonas (o primeros mensajeros), al lado interno de la célula, efectuando una amplia gama de

efectos biológicos (2, 6).

Los estudios actuales demuestran, que el AMPc es el segundo mensajero de muchas hormonas: prostaglandina E<sub>1</sub> (16), interleucina 1 (17), histamina (18) y el factor de crecimiento epidérmico (19), entre otros; además de la adrenalina y del glucagon.

A pesar de estos avances, se desconocía aún cómo la unión de una hormona a un receptor específico ocasionaba la activación de la adenilato ciclasa. Se propusieron entonces dos hipótesis sobre este mecanismo:

Un modelo sugería que el complejo hormona-receptor se unía directamente a la adenilato ciclasa, y la activaba.

Sin embargo, existían evidencias para proponer un segundo modelo en el que la unión de la hormona a su receptor apropiado causaba la activación de otra molécula de la membrana que era la encargada de activar directamente a la enzima.

Fue el grupo de Rodbell, en 1980 (20) quien demostró la existencia de una proteína transmisora que une nucleótidos de guanina, denominada proteína G. El complejo hormona-receptor no activa directamente a la adenilato-ciclasa, sino que el receptor activado estimula a la proteína G, la cual transporta la señal activadora a la enzima amplificadora, en este caso la adenilato ciclasa.

Actualmente se sabe de la existencia de varias proteínas G, todas ellas constituyentes de una gran familia de proteínas homólogas, acopladas a diferentes rutas transductoras (21). Todas ellas tienen en común el ser proteínas con una estructura heterotrimérica, constituidas por las subunidades  $\alpha$  (39 a 52

KDa),  $\beta$  (35 a 36 KDa) y  $\gamma$  (8 a 10 KDa), cada una producto de un gen distinto (22).

Estas proteínas se distinguen, principalmente, por la subunidad  $\alpha$ , la cual contiene el sitio de unión para los nucleótidos de guanina y posee actividad de GTPasa. En el estado no activo de estas proteínas G, la subunidad tiene unido GDP y está asociada al complejo  $\beta - \gamma$ . Cuando una hormona se une a su receptor, hay un intercambio de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$ , y el complejo se disocia y queda libre el  $\alpha$ -GTP de  $\beta - \gamma$ . En este estado activo, la subunidad alfa de las diferentes proteínas G interacciona directamente con la enzima amplificadora (adenilato ciclasa) (21).

Muchos de los estudios realizados sobre éstas proteínas, para aclarar sus mecanismos de acción, se deben a la utilización de toxinas bacterianas (principalmente la toxina del cólera y la toxina pertusis), gracias al hecho de que éstas ADP ribosilan a la subunidad alfa y alteran sus funciones (23, 24).

Por su parte, la subunidad beta y gama forman un complejo, el cual, al parecer, mantiene unida a la proteína G a la membrana (25).

Hasta el momento, los estudios descritos en la presente introducción, demuestran que el mecanismo de acción de un gran número de mensajeros es activando al sistema de la adenilato ciclasa de una manera estimuladora, incrementando los niveles del segundo mensajero AMPc. A la proteína G de este sistema se le denominó  $G_s$  por estimular a la enzima. La toxina del cólera la reconoce como su sustrato, y ADP ribosila su subunidad  $\alpha_s$ , lo que bloquea su actividad de GTPasa, dejándola permanentemente

activa y estimulando la producción de AMPc.

Sin embargo, la elucidación de este sistema estaba parcialmente resuelto.

Algunos trabajos realizados a principios de los ochentas indicaban que varias hormonas y neurotransmisores en vez de activar a la adenilato ciclasa parecían inhibir su acción (20, 26), lo que sugirió la presencia de un elemento distinto en el sistema. Este nuevo elemento resultó ser una proteína G cuya acción era inhibitoria. La toxina pertusis demostró ser una herramienta muy útil para comprobar su existencia y su papel en este mecanismo, ya que actúa sobre la subunidad alfa ( $\alpha_i$ ), de la proteína G inhibitoria ( $G_i$ ), e impide la interrelación de la subunidad activa,  $\alpha_i$ -GTP, con la adenilato ciclasa, y deja a la proteína G activa, pero incapaz de ejercer su acción de inhibir a la enzima (24).

El modelo actual del funcionamiento del sistema de transducción de la adenilato ciclasa, con los elementos descritos, es el siguiente:

Para este sistema se han descrito receptores acoplados de manera estimulatoria, que incrementan los niveles de AMPc, y receptores acoplados de manera inhibitoria, que los disminuyen. Ejemplos de estos últimos son: el receptor  $\alpha_2$  adrenérgico (27), el receptor  $M_2$  colinérgico (muscarínico) (28) y el receptor  $D_2$  dopaminérgico (29).

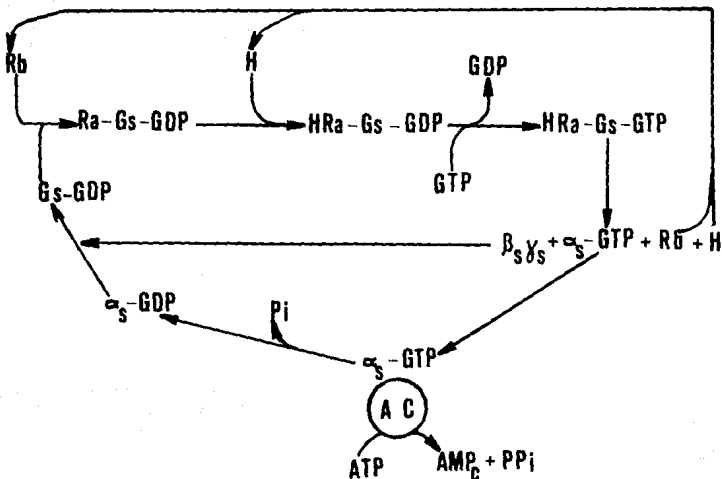
El receptor, ya sea activador o inhibidor de la ciclasa, en un estado de baja afinidad se asocia con una proteína G ( $G_s$  o  $G_i$ ) unida a GDP. Esta asociación permite que el receptor pase a un estado de alta afinidad ( $R_a$ ) para el mensajero, y forme ahora el

complejo  $\beta$ -G-GDP, el cual puede interaccionar con la subunidad  $\alpha$ . En el momento que ésta última se une al receptor, se produce la substitución de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de la proteína G; el receptor, por su parte, se disocia del complejo, y pasa nuevamente a su estado de baja afinidad. La subunidad  $\alpha$ -GTP (ya sea  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$ ), queda entonces en su forma libre al disociarse del complejo  $\beta$ - $\gamma$ , y la disociación permite la activación o inhibición de la adenilato ciclasa.

La hidrólisis de GTP a GDP, gracias a la actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ , permite la reasociación de la subunidad  $\alpha$ -GDP al complejo  $\beta$ - $\gamma$ , que regenera el sistema (esquema 2) (1).

#### 4.2 SISTEMA DE TRANSDUCCION DE LOS FOSFOINOSITIDOS CALCIO.

En el año de 1953, Mabel y Lowel Hokin (citado en 31, 127), en el Hospital General de Montreal, en Canadá, observaron que la administración de acetil colina a las células secretoras del páncreas incrementaba la incorporación de fósforo radiactivo a fosfatidilinositol (PI), que es uno de los fosfolípidos constituyentes de la membrana celular. Como otros lípidos de la membrana, este fosfoinosítido contiene una parte hidrofóbica (dos cadenas de ácidos grasos unidos a glicerol), ligada a otra hidrofílica, el inositol. El aumento en la incorporación de fósforo  $^{32}$  observado por los Hokin era un proceso secundario, consecuencia de la posterior resíntesis del PI (30, 31). Con estos estudios se encontró que una señal externa estimulaba el ciclo de recambio del lípido. Los Hokin propusieron que este recambio, provocado por la acetil colina, guardaba relación con el mecanismo de exocitosis por el que las células del páncreas



ESQUEMA 2.

Modelo cinético para la estimulación de la adenilato ciclasa:  $R_b$ , receptor en estado de baja afinidad;  $R_a$ , receptor en estado de alta afinidad;  $G_s$ , proteína acopladora activatoria;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , subunidades de la proteína  $G_s$ ;  $H$ , hormona;  $GTP$ , trifosfato de guanina;  $GDP$ , difosfato de guanina;  $AC$ , Adenilato Ciclasa. Tomado de García- Sáinz, J.A. (ref. 1).



liberan enzimas digestivas.

Los estudios posteriores han permitido conocer que el recambio de fosfoinosítidos desempeña un papel importante en la transmisión de la información contenida en muchos mensajeros químicos, como ciertas hormonas (epinefrina (32, 33), vasopresina (34), serotonina (35), angiotensina (34, 36), etc), mediadores químicos locales (como la histamina (37, 38)) y neurotransmisores (como la acetil colina (39) ).

Los fosfoinosítidos se presentan en la membrana plasmática en tres formas, las cuales son interconvertibles, gracias a la acción de cinasas y fosfomonoesterasas, que los mantienen en un equilibrio dinámico. Estas formas son: el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP) y el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), ver esquema 3.

En 1975, Michell (40), encontró que existía una relación entre la activación del recambio de fosfoinosítidos y la concentración de calcio citosólico, insinuándose la participación de este fenómeno en la transmisión de la señal de muchos mensajeros, ya que el papel del calcio como segundo mensajero se empezaba a evidenciar en diversos sistemas celulares. Además propuso que uno de los tres lípidos de inositol, el PIP<sub>2</sub>, parecía hidrolizarse en relación al mecanismo de movilización de calcio.

Con el antecedente del trabajo de Dawson realizado en el año de 1964, sobre la producción de IP<sub>3</sub> (inositol trifosfato) a partir de la hidrólisis de PIP<sub>2</sub>, y el de Michell en 1975, Berridge y colaboradores, en 1984, demostraron el papel del IP<sub>3</sub> como el segundo mensajero responsable de la movilización del



calcio y del desencadenamiento de la respuesta celular en glándulas salivales de mosca (41).

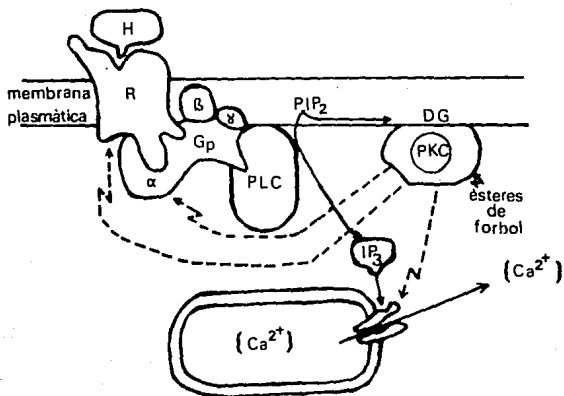
Los estudios posteriores han demostrado que el  $IP_3$  constituye uno de los segundos mensajeros, junto con el calcio y el diacilglicerol, también producto de la hidrólisis del  $PIP_2$ , de otro de los sistemas implicados en la transducción de señales químicas extracelulares, ampliamente difundido entre los seres vivos: el "Sistema de los Fosfoinosítidos-Calcio" (esquema 3 y 4).

Este mecanismo interviene en una gran cantidad de respuestas en diversos sistemas celulares: glucogenólisis en células hepáticas, secreción de histamina, serotonina y heparina en mastocitos, liberación de serotonina por plaquetas sanguíneas y contracción del músculo liso, entre otros.

El sistema de transducción de los fosfoinosítidos-calcio está constituido por tres componentes, localizados en la membrana plasmática:

- A) Un receptor que detecta una señal química externa.
- B) Una proteína G, que sirve de acopladora entre el receptor y una proteína efectora.
- C) La enzima fosfolipasa C, que se encarga de hidrolizar al  $PIP_2$  y generar, como consecuencia de ello, los dos segundos mensajeros del sistema: el  $IP_3$  y el diacilglicerol (42) (Esquema 4).

Los receptores que se acoplan a este sistema de transducción (como los  $\alpha_1$  adrenérgicos, el receptor  $AT_1$  a angiotensina y el de vasopresina), son miembros de una familia de glucoproteínas integrales de membrana que contienen siete dominios hidrofóbicos transmembranales, con seis asas conectoras, tres que miran hacia



#### ESQUEMA 4.

Modelo del sistema de transducción de los fosfoinosítidos-calcio: H, hormona; R, receptor; Gp, proteína G acopladora; PLC, fosfolipasa C; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5 trifosfato; DG, diacilglicerol; PKC, proteína cinasa C. Tomado de García- Sáinz, J. A. (ref. 44).

el espacio extracelular y tres hacia el espacio intracelular. Los dominios intramembranales definen los requerimientos estereoquímicos para la unión de los agonistas y los antagonistas, mientras que las asas intracelulares determinan su interacción con proteínas G específicas (43, 44).

El papel de la proteína G en este sistema es, al parecer, el mismo que realiza en el de la adenilato-ciclasa. Esta proteína G, denominada G<sub>p</sub>, se propuso inicialmente como elemento de importancia en el acoplamiento del receptor a la proteína efectora, por evidencias indirectas de su existencia. Entre éstas se encuentra el incremento en la actividad de la fosfolipasa C, con la adición de análogos no hidrolizables de GTP; la inhibición de la actividad de GTPasa de la subunidad  $\alpha$ , por acción de AlF<sub>3</sub> (que se mantiene en su forma activa), y por la sensibilidad que presenta a la toxina pertusis en algunos sistemas celulares, éste último sugiere la existencia de por lo menos dos proteínas G<sub>p</sub> que activan a la fosfolipasa C: una sensible a toxina pertusis y otra insensible (45 a 48).

Recientemente varios grupos de investigadores, se han dedicado a la tarea de identificar y purificar a esta o estas proteínas G. Exton y colaboradores (49-51), han identificado dos proteínas G insensibles a la toxina pertusis, con pesos de 42 y 43 KDa, que activan a una de las isoenzimas de la fosfolipasa C (la isoenzima  $\beta$ 1). Sin embargo, aún se desconocen muchas de las propiedades de estas proteínas G, y queda por esclarecerse el papel que desempeñan las que parecen acoplarse al sistema; la probable existencia de una proteína G<sub>p</sub>i que se acopla inhibitoriamente y su mecanismo de acción.

El tercer elemento de este sistema transduccional es la enzima fosfolipasa C (PLC), encargada de generar los segundos mensajeros a partir del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Hasta la fecha han sido identificadas cuatro formas de esta enzima, de pesos moleculares distintos (PLC $\alpha$ : 65KDa; PLC $\beta$ : 150KDa; PLC $\gamma$ : 145KDa; y PLC $\delta$ : 85KDa), al parecer productos de genes diferentes (52).

Aunque todavía no se conoce el papel exacto de estas proteínas y el porqué de su diversidad, los estudios recientes han propuesto que cada forma sea activada por distintas proteínas G (49, 50, 52).

Las cuatro isoenzimas hidrolizan al PIP<sub>2</sub> y generan dos segundos mensajeros: el IP<sub>3</sub> y el diacilglicerol. El IP<sub>3</sub> moviliza calcio del retículo endoplásmico, interactuando con un receptor específico que se encuentra acoplado o forma parte de un canal que libera calcio, mecanismo de acción que aún no se ha definido (42, 44).

La importancia de este ión como mediador del metabolismo celular, en respuesta a procesos de señalización, es tal, que habitualmente la concentración de calcio libre es varios ordenes de magnitud menor en el citoplasma que la concentración en el medio extracelular. El mantenimiento de estas diferencias de concentración depende de dos características de la membrana plasmática: su baja permeabilidad al calcio y la presencia de sistemas de transporte para su expulsión.

Cuando es activada la ruta de transducción de los fosfoinosítidos, parte de la señal actúa directamente sobre la concentración de calcio citoplásmica, que aumenta en forma

considerable, por la apertura transitoria de conductos de calcio en la membrana plasmática o en una membrana intracelular.

El calcio liberado, actúa como un activador de proteínas de forma directa o indirecta (a través de proteínas cinasas dependientes de calcio), y de esta manera se propaga intracelularmente parte de la señal del mensajero químico (53).

Por su parte, el diacilglicerol, cuya naturaleza hidrofóbica le impide abandonar la membrana plasmática, tiene una aparición transitoria y su degradación es rápida. El principal papel de este segundo mensajero es activar a la proteína cinasa C (PKC), enzima descubierta en 1977 por Nishizuka y colaboradores (54).

Hasta el momento se han identificado siete subespecies de PKC, con un peso aproximado de 77 KDa, que muestran un diferente patrón de distribución y expresión, que sugiere puedan tener distintas funciones (44, 54).

Entre las varias funciones asignadas a la proteína cinasa C se incluyen: la secreción y exocitosis, la modulación de la conductancia iónica, la regulación de la interacción del receptor con componentes del aparato de transducción de señales, la contracción del músculo liso, la expresión genética y la proliferación celular (55).

Para su activación, esta enzima requiere de calcio y fosfatidilserina. Cuando se encuentra inactiva se localiza principalmente en el citoplasma, mientras que la forma activa se transloca a la membrana plasmática mediante un sistema dependiente de calcio (56 a 59).

Uno de los aspectos de mayor interés del estudio de la PKC, en la última década, ha sido su capacidad de modular la función

de elementos participantes en los sistemas de transducción existentes, como receptores, proteínas G, y efectores membranales (adenilato ciclasa, fosfolipasa C y algunos canales iónicos), en los que inhibe o potencia su actividad.

Gran parte de los avances en esta área han sido gracias a la utilización de los ésteres de forbol, potentes promotores tumorales derivados de alcoholes policíclicos, que activan a la PKC. El forbol-12-miristato-13-acetato (TPA), es uno de los ésteres de forbol más activos y utilizados para estudiar las funciones de la PKC.

Entre los efectos del TPA se encuentran la inhibición de la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica (glucogenólisis, gluconeogénesis y la ureogénesis) en células hepáticas de rata, al parecer por la fosforilación del receptor, que provoca un cambio en su estado de afinidad por el agonista; este es un ejemplo claro de regulación por retroalimentación negativa (60, 61).

Por otra parte, se ha observado que en algunos sistemas los ésteres de forbol incrementan la acumulación de AMPc, inducido por hormonas y neurotransmisores que promueven la acción  $\beta$  adrenérgica, ésto por fosforilación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa que incrementa su actividad (44, 62, 63). En contraste, en algunas células, estos ésteres promueven la desensibilización de la adenilato ciclasa, lo que disminuye su actividad (64).

En estudios recientes con TPA se ha observado que la PKC bloquea la inhibición hormonal de la adenilato ciclasa, al fosforilar a la proteína  $G_i$ , lo que disminuye marcadamente su actividad de GTPasa (65-67).



Como se vió, la activación de la proteína cinasa C puede regular al sistema de la adenilato ciclasa, por acción directa sobre los componentes de este sistema transduccional, provocando, en consecuencia, un aumento o disminución en los niveles de AMPc.

Recientemente se ha propuesto la participación de las diferentes isoformas de la PKC para explicar su acción opuesta observada en los distintos modelos celulares (68).

Todos estos resultados han empezado a dilucidar la complejidad de la regulación del metabolismo celular por acción hormonal, que consiste no únicamente de la activación de una ruta transduccional específica por un mensajero químico, si no de la interacción de todo un sistema comunicador complejo, altamente especializado, que coordina con toda precisión la actividad celular en respuesta a las señales externas.

#### **4.3 ACCION DE AGENTES ADREMERGICOS.**

En el año de 1895, Oliver y Shafer, al trabajar con extractos de médula adrenal de mamífero, identificaron a la adrenalina (epinefrina), como el compuesto responsable de la vasoconstricción y la elevación de la presión sanguínea al inyectarlo en la circulación. Posteriormente Stolz y Dakin determinaron su composición química, lográndola sintetizar (69).

Han transcurrido cerca de 100 años, a partir de su descubrimiento y se han realizado muchos trabajos para determinar con detalle sus efectos y los mecanismos de acción sobre los diferentes sistemas celulares en los que ejerce su acción.

La epinefrina, junto con la norepinefrina y la dopamina,

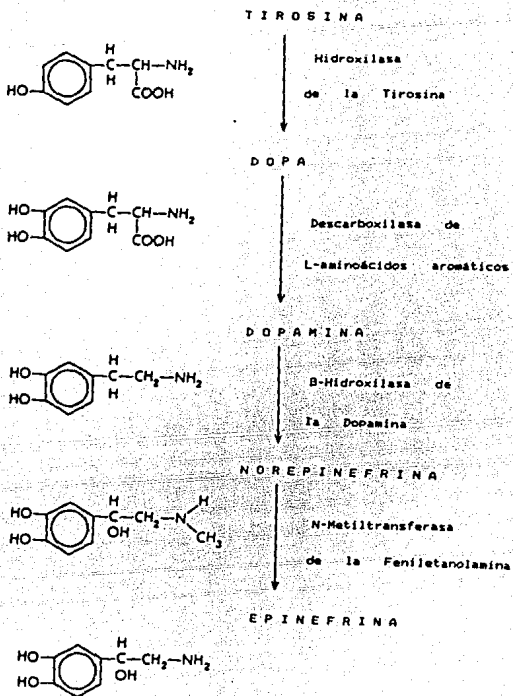
constituyen al grupo de las catecolaminas, agentes con una amplia variedad de efectos sobre diferentes tejidos.

Estos tres compuestos se sintetizan a partir de un aminoácido precursor: la tirosina, siguiendo una serie de pasos enzimáticos, que culminan con la epinefrina (70) (esquema 5).

La epinefrina se sintetizada y se almacena en la médula adrenal y se liberada al torrente sanguíneo, por el que llega a diferentes tejidos, donde actúa como un mensajero de tipo hormonal. Ejerce funciones importantes en mamíferos, donde ha sido objeto de numerosos estudios. Entre sus efectos principales se encuentra el aumento de la presión sanguínea y la regulación de la frecuencia cardíaca; el aumento de la glucogenólisis en el hígado; la regulación de la contracción del músculo liso, y el control de la secreción hormonal de las glándulas endócrinas y exócrinas, entre otras muchas funciones. Además la epinefrina también actúa como un neurotransmisor en ciertas regiones del sistema nervioso central (69).

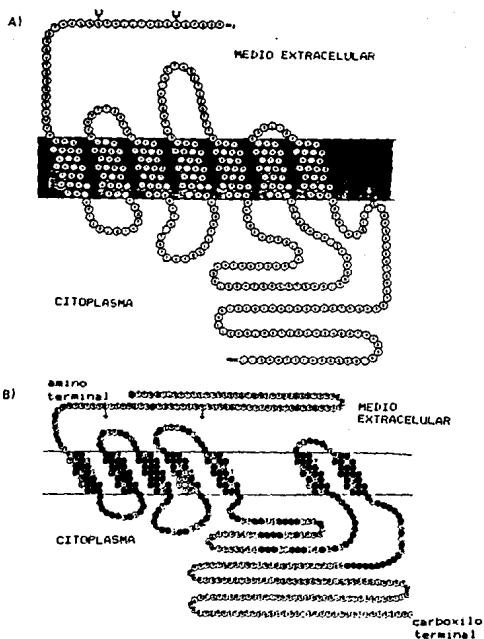
Por su parte, la norepinefrina ejerce sus acciones como un neurotransmisor periférico; se sintetiza y se almacena en las terminaciones nerviosas de neuronas del sistema nervioso simpático y se libera en tejidos inervados, en donde ejerce sus efectos fisiológicos localmente. Como hormona, se libera por la glándula suprarrenal y estimula la contracción del corazón, dilata los bronquios y eleva la fuerza contráctil de los músculos (69).

Por último, la dopamina actúa como un neurotransmisor del sistema nervioso central. Es el precursor inmediato de la norepinefrina y la epinefrina y tiene efectos sobre la regulación



**ESQUEMA 5.**

Biosíntesis de las Catecolaminas (tomado de la referencia 128).



### ESQUEMA 6.

Modelo estructural de algunos de los receptores adrenérgicos.

A) Receptor  $\beta_2$  adrenérgico de humano. Tomado de la referencia 77.

B) Receptor  $\alpha_{1a}$  adrenérgico de corteza cerebral de rata. Los círculos sólidos indican los aminoácidos idénticos en la posición correspondiente en el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico de rata. Tomado de la referencia 10.

RECEPTOR	SUBTIPO	SISTEMA DE TRANSDUCCION
α <sub>1</sub> ADRENERGICO	α <sub>1A</sub>	FOSFOINOSITIDOS-CALCIO (aún no caracterizado completamente)
	α <sub>1B</sub>	FOSFOINOSITIDOS-CALCIO
	α <sub>1C</sub>	DESCONOCIDO
α <sub>2</sub> ADRENERGICO	α <sub>2A</sub>	ADENILATO CICLASA (INHIBITORIAMENTE)
	α <sub>2B</sub>	ADENILATO CICLASA (INHIBITORIAMENTE)
β <sub>1</sub> ADRENERGICO	DESCONOCIDO	ADENILATO CICLASA (ESTIMULATORIAMENTE)
β <sub>2</sub> ADRENERGICO	DESCONOCIDO	ADENILATO CICLASA (ESTIMULATORIAMENTE)
β <sub>3</sub> ADRENERGICO	DESCONOCIDO	ADENILATO CICLASA (ESTIMULATORIAMENTE)
H <sub>1</sub> A HISTAMINA	DESCONOCIDO	FOSFOINOSITIDOS-CALCIO
H <sub>2</sub> A HISTAMINA	DESCONOCIDO	ADENILATO CICLASA (ESTIMULATORIAMENTE)
H <sub>3</sub> A HISTAMINA	DESCONOCIDO	DESCONOCIDO
AT <sub>1</sub> A ANGIOTENSINA II	DESCONOCIDO	FOSFOINOSITIDOS-CALCIO ADENILATO CICLASA
AT <sub>2</sub> A ANGIOTENSINA II	DESCONOCIDO	DESCONOCIDO

TABLA 2.

Ejemplos de algunos receptores acoplados a sistemas de transducción específicos.

cardiovascular (69).

Las catecolaminas, dado su carácter hidrofílico, se unen a proteínas receptoras específicas, situadas en la superficie celular para poder ejercer sus efectos.

A continuación se hará una breve revisión de las características de los receptores adrenérgicos, en especial sobre los  $\alpha_1$ , acoplados estimulatoriamente al sistema transduccional de los fosfoinosítidos-calcio.

El estudio de los receptores adrenérgicos se inicia en el año de 1948, cuando R.P. Alquist, estudiando la acción de la epinefrina y compuestos relacionados estructuralmente con ella, propuso la existencia de dos subtipos de receptores, basados en el orden de potencia observado y en el efecto producido en diferentes tejidos: los  $\beta$  adrenérgicos, que median en general fenómenos estimulatorios, y los  $\alpha$  adrenérgicos asociados a procesos inhibitorios (71).

El interés desarrollado en esta área del conocimiento, por los descubrimientos anteriores, llevaron al grupo de Lands, en 1967, a proponer la existencia de dos subtipos de receptores  $\beta$  adrenérgicos, en función de las distintas acciones fisiológicas observadas y de su especificidad farmacológica: los  $\beta_1$  adrenérgicos, localizados predominantemente en el tejido cardiaco, con la misma sensibilidad a epinefrina que a norepinefrina, y los  $\beta_2$  adrenérgicos, ampliamente distribuidos en el músculo liso, que presentan mayor sensibilidad a la epinefrina que a la norepinefrina (71), ver Tabla 1.

El desarrollo de agentes farmacológicos y de técnicas bioquímicas permitió demostrar, en ese mismo año, que la

RECEPTOR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS
$\alpha_1$	Epi:Norepi»Iso	Prazosina
$\alpha_2$	Epi:Norepi»Iso	Yohimbina
$\beta_1$	Iso»Epi=Norepi	Metoprolol CGP20712A
$\beta_2$	Iso»Epi»Norepi	Butoxamina ICI118551

**TABLA 1.**

Potencia de Agonista Adrenérgicos.

Epi=Epinefrina

Norepi=Norepinefrina

Iso=Isoproterenol

Tomado de la referencia 128.

respuesta  $\beta$  adrenérgica se encontraba asociada con la activación de la enzima adenilato ciclasa (72).

El avance de esta área durante los últimos veinte años, ha sido tal que se ha logrado la purificación de los receptores  $\beta$  adrenérgicos (73, 74). Gracias a ésto fue posible la comprensión con detalle de la estructura molecular de estas proteínas, mediante la utilización de tecnología del ADN recombinante y de clonación.

Estos estudios demostraron que ambas proteínas se encuentran constituidas por aproximadamente 450 residuos de aminoácidos. El análisis de la hidrofobicidad de la secuencia primaria de estas proteínas, demostró que contienen siete dominios hidrofóbicos transmembranales, conectados entre sí por tres asas extracelulares y tres intracelulares. Las regiones amino y carboxilo terminales se localizan en el espacio extracelular e intracelular, respectivamente (43, 73, 74) (Esquema 6).

Los estudios realizados con agonistas y antagonistas, marcados radiactivamente, han mostrado la probable intervención de los 4 primeros dominios intracelulares para la unión del agonista, y del séptimo para la unión de los antagonistas (22, 43, 75). Por su parte, estudios recientes demuestran que la tercera asa intracelular, es el dominio que interactúa con la proteína G (76, 77).

Con estudios de clonación se han revelado grandes similitudes en la estructura primaria de distintos receptores (como los  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, el muscarínico, el de serotonina, el de dopamina y la rodopsina). Estos receptores tienen como característica el interactuar con proteínas G, para activar o



inhibir a una proteína efectora. En especial estas similitudes se refieren a la presencia de dominios intramembranales, que permite proponer la existencia de una superfamilia de proteínas receptoras, cuya estructura y mecanismos de acción han variado muy poco a lo largo del proceso evolutivo (127).

Los receptores  $\beta$  adrenérgicos se acoplan de manera estimuladora a la enzima adenilato ciclasa, a través de una proteína G, denominada Gs. El mecanismo de acción de este sistema transduccional fue tratado con detalle con anterioridad (tabla 2).

De modo similar, los receptores  $\alpha$  adrenérgicos fueron divididos en dos subtipos en función de consideraciones de localización anatómica, funcionales y farmacológicas:

- Los  $\alpha_1$  Adrenérgicos, inicialmente localizados en sitios postsinápticos, donde median respuestas excitatorias (78, 79); y,
- Los  $\alpha_2$  Adrenérgicos, que por su parte fueron situados en zonas presinápticas, mediando efectos inhibitorios (78, 79).

En un principio, la división de los receptores alfa adrenérgicos, por Langer (78), consideraba la participación de ambos receptores ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ) en la inhibición de la enzima adenilato ciclasa.

Con los trabajos de García-Sáinz y Fain, en 1980 (32), se demostró la utilización, por estos subtipos, de diferentes mecanismos de transducción de señales: los  $\alpha_1$ , participando en los efectos metabólicos de las catecolaminas que provocan un recambio de fosfoinosítidos y la movilización de calcio intracelular, y los  $\alpha_2$  que fueron asociados con la inhibición de la adenilato ciclasa, a través de mecanismos independientes de

calcio (32), ver tabla 2.

La importancia de este hallazgo se refleja en la gran cantidad de estudios realizados durante la última década, sobre la caracterización farmacológica, molecular y funcional de ambos tipos de receptores alfa adrenérgicos; como consecuencia de ellos resultaron una serie de evidencias que proponen la existencia de subtipos de receptores  $\alpha_1$  (9, 10, 80 a 84) y  $\alpha_2$  adrenérgicos (85, 86).

Para el receptor  $\alpha_1$  adrenérgico se ha propuesto la existencia de dos subtipos de receptores: los  $\alpha_{1a}$  y los  $\alpha_{1b}$  (9, 80 a 82). Ambos subtipos han sido clonados y expresados obteniéndose su estructura primaria (10, 83) (Esquema 6).

El grupo de Lefkowitz, recientemente, clonó y expresó un nuevo subtipo de receptor  $\alpha_1$ , denominado  $\alpha_{1c}$ , de cerebro de bovino (84). Sin embargo, aún se desconocen sus propiedades funcionales.

Se ha informado que los subtipos  $\alpha_{1a}$  y  $\alpha_{1b}$ , utilizan distintos mecanismos moleculares para transmitir la señal.

Un subtipo, el  $\alpha_{1b}$ , estimula la formación de fosfatos de inositol como evento inicial, movilizándolo calcio de depósitos intracelulares, independientemente del calcio externo (87 a 90).

El otro subtipo ( $\alpha_{1a}$ ), activa canales de calcio sensibles a dihidropiridinas, presentes en la membrana citoplasmática, y provoca el influjo de calcio extracelular, como fenómeno inicial, y la formación de fosfatos de inositol como proceso secundario (87 a 90).

La proposición de ambos fenómenos ha sido el resultado de la utilización de diferentes antagonistas y agonistas selectivos

para cada uno de los subtipos: 5-metil urapidil (5-MU) (81), WB4101 (80), y la cloroetilclonidina (CEC) (80, 82); los dos primeros son antagonistas selectivos para el subtipo  $\alpha_{1a}$  y el segundo para el  $\alpha_{1b}$ . En cuanto a los agonistas utilizados con más frecuencia, la metoxamina, un agonista  $\alpha_{1a}$  adrenérgico, ha resultado de gran utilidad (88).

#### 4.4 ACCION DE AGENTES HISTAMINERGICOS.

La histamina es una hormona local, derivada del aminoácido histidina; es sintetizada y secretada principalmente por las células cebadas. Estas células que se encuentran en el tejido conjuntivo de todo el cuerpo, almacenan la histamina en grandes vesículas secretoras y la liberan rápidamente por exocitosis cuando son estimuladas por una lesión, una infección local o ciertas reacciones inmunológicas. La histamina hace que los vasos sanguíneos se dilaten y se vuelvan permeables, lo que permite el acceso de proteínas séricas y glóbulos blancos a los lugares de la lesión. Además, la histamina participa en la regulación de la secreción ácida gástrica, y en la contracción del músculo liso (intestino y tracto respiratorio), entre otros efectos (4, 91).

Recientemente, se ha propuesto su participación como neurotransmisor del sistema nervioso central, donde ejerce sus acciones sobre la regulación de la temperatura corporal y la dinámica vascular (91, 92).

La acción de la histamina se inicia por su interacción con receptores específicos, localizados sobre la superficie externa de la membrana plasmática; al utilizar ligandos selectivos

(agonistas y antagonistas), se han diferenciado tres tipos de receptores histaminérgicos, denominados:  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$  (11, 91).

Cada uno de estos receptores media efectos específicos de la histamina, a través de sistemas transduccionales determinados (tabla 2).

a) El receptor  $H_1$  se encuentra acoplado al recambio de fosfoinosítidos y la señal de calcio, siguiendo el modelo ya descrito (37,92,93). La activación de este receptor provoca la broncoconstricción, la contracción intestinal, el incremento en la permeabilidad capilar, la dilatación de pequeños vasos sanguíneos y las reacciones alérgicas, entre otros muchos efectos. Estas acciones son bloqueadas por antagonistas  $H_1$  selectivos como la pirilamina (una etilenediamina) y la clorfeniramina (una alquilamina) (91), los cuales actúan como inhibidores competitivos reversibles de la acción de histamina. Por otra parte el 2-(2-aminoetil)-tiazol (un análogo de histamina), es un potente agonista  $H_1$ , muy utilizado en estudios de tipo farmacológico (11, 37, 124).

b) En contraste, el receptor  $H_2$  se asocia al sistema de la adenilato ciclasa estimulatoriamente (92). Entre los efectos mediados por este receptor se encuentran el incremento en la fuerza de contracción cardiaca, la dilatación capilar y la secreción ácida gástrica. Los antagonistas  $H_2$  como la cimetidina y la ranitidina, además de ser usados clínicamente contra úlceras pépticas (91), se utilizan como potentes agentes antagónicos en estudios de tipo farmacológicos (11, 37, 124). En cuanto a los agonistas  $H_2$ , la impromidina y el dimaprit, dos análogos de histamina, son utilizados frecuentemente en estudios

farmacológicos (11, 91, 124).

c) Por último, el receptor  $H_3$ , localizado principalmente en el sistema nervioso, en zonas presinápticas, parece intervenir en la liberación de otros neurotransmisores (92). El mecanismo de transducción del receptor  $H_3$  aún se desconoce. Sin embargo, recientemente, se ha propuesto un acoplamiento inhibitorio a la adenilato ciclasa (94).

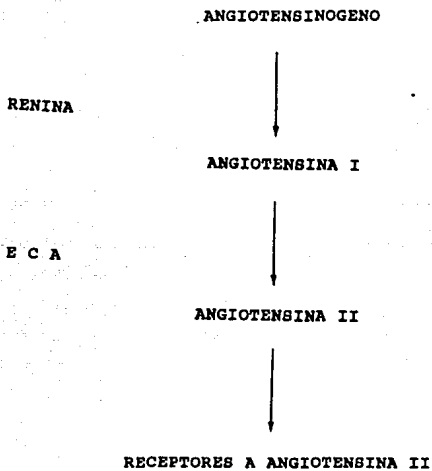
#### 4.5 ACCION DE ANGIOTENSINA II.

La angiotensina II es un octapéptido que se forma por la separación de dos aminoácidos del decapeptido angiotensina I, el cual, a su vez, es un fragmento separado del angiotensinógeno (una  $\alpha_2$  globulina), por la renina, ésta última elaborada por las células yuxtglomerulares del riñón (esquema 7). Este complejo hormonal y enzimático participa en el sistema renina-angiotensina que se encarga de la regulación de la homeostasis cardiovascular y del balance normal de sodio en el organismo.

La hormona activa de este sistema es la angiotensina II, cuyas acciones se realizan a través de receptores específicos localizados en varios órganos y tejidos (corteza cerebral, riñón, sistema cardiovascular, hígado y órganos reproductivos) (95).

Algunos de los efectos fisiológicos de la angiotensina son: un potente efecto vasoconstrictor, de acción muy breve; estimulación de la liberación de aldosterona, que promueve la absorción de sodio y agua en el riñón; inhibición directa de la secreción de renina por las células granulares y estimulación de la secreción de angiotensinógeno (96).

En el hígado de rata, la angiotensina, estimula una



**ESQUEMA 7.**

Sistema renina-angiotensina: ECA, enzima convertidora de angiotensina (tomado de 95).

variedad de procesos metabólicos, que incluyen la activación de la glucogenólisis (36, 97), la ureogénesis (34) y la gluconeogénesis (101, 130), a través del subtipo de receptor  $AT_1$  que se acopla al sistema de los fosfoinosítidos-calcio (34, 36, 98); es necesario para la activación de estas rutas la presencia de calcio extracelular (99).

Por su parte, hay una serie de evidencias que proponen la existencia de otro subtipo de receptor, denominado  $AT_2$ , el cual parece estar acoplado a la reducción de los niveles de GMPc por un mecanismo desconocido (100).

La caracterización farmacológica de estos dos receptores ha sido posible gracias al desarrollo de una gran cantidad de agentes antagónicos de tipo no peptídico (95). Entre éstos, el DUP 753 y el PD 123177 se caracterizan por ser potentes inhibidores competitivos de la acción de angiotensina II (36, 95, 100).

El DUP 753, un antagonista  $AT_1$ , y el PD 123177, un antagonista  $AT_2$ , demuestran potentes efectos antihipertensivos (95).

##### 5. REGULACION HORMONAL DEL METABOLISMO HEPATICO:GLUCOGENOLISIS.

El hígado es uno de los órganos de mayor interés por la amplia variedad de funciones que desempeña en el organismo. Entre éstas se encuentran: la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos, así como la biotransformación de drogas.

De ésta y otras muchas funciones, tal vez una de las más importantes y estudiadas es la que se refiere al metabolismo de la glucosa, principalmente en mamíferos.

El hígado mantiene los niveles estables de este azúcar en el torrente sanguíneo, gracias a la existencia de dos mecanismos enzimáticos complejos: la glucogenólisis y la gluconeogénesis. Ambas vías han sido objeto de un gran número de trabajos que tratan de comprender como se regulan por acción hormonal (4, 36, 60, 88, 101).

Entre las hormonas implicadas se encuentran: la epinefrina, secretada por la médula adrenal, y el glucagon y la insulina secretados por el páncreas. Aunque estas hormonas tienen numerosos efectos metabólicos sobre el hígado, sólo se analizarán brevemente los que se hallan relacionados en la regulación del metabolismo de la glucosa.

Existen dos direcciones importantes para utilizar la glucosa: diversos órganos y tejidos, como son el cerebro, corazón, músculo esquelético, etc, pueden oxidarla para la producción de energía, o puede ser polimerizada como glucógeno o convertirse en grasa para su almacenamiento. La epinefrina que es secretada en respuesta a estados de alerta o "stress", y el glucagon que es liberado cuando disminuyen los niveles de azúcar, estimulan la degradación de glucógeno a glucosa (glucogenólisis), principalmente en el músculo y en las células hepáticas. Por el contrario la insulina, que es secretada en respuesta a los altos niveles de azúcar en la sangre, estimula la polimerización de la glucosa a glucógeno en el hígado (gluconeogénesis) (4, 102).

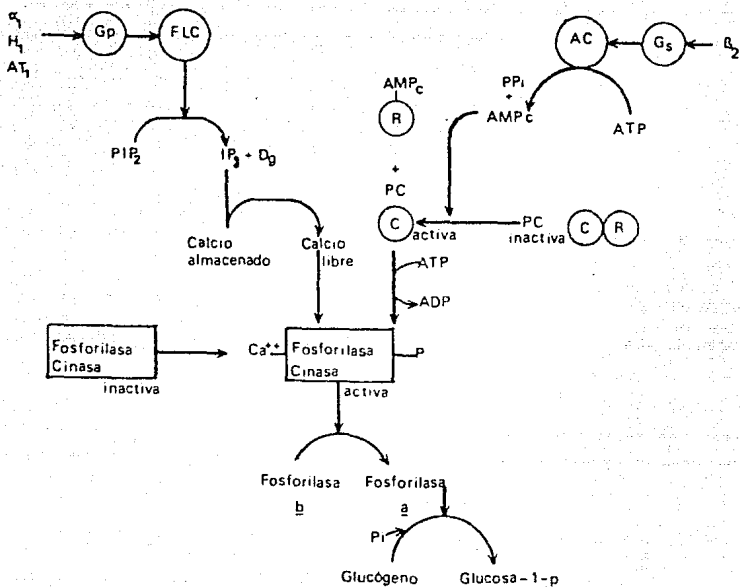
Las enzimas encargadas en la degradación y síntesis de glucógeno, son la glucógeno fosforilasa (o fosforilasa) y la glucógeno sintetasa, respectivamente.



La epinefrina y el glucagon provocan una marcada activación de la fosforilasa y una inhibición de la glucógeno sintetasa, que promueve la degradación del glucógeno. La insulina, por el contrario, estimula la incorporación de la glucosa y activa a la glucógeno sintetasa dando lugar a la formación de glucógeno (102).

A continuación se revisarán dos de los mecanismos hormonales que llevan a la activación de la glucogenólisis. En células hepáticas, la secuencia de cada uno de éstos es la siguiente:

- a) Algunas hormonas como la epinefrina (a través de la respuesta  $\beta$  adrenérgica) y el glucagon, se unen a receptores localizados en la membrana plasmática y activan, por medio de una proteína Gs, a la adenilato ciclasa.
- b) La adenilato ciclasa, en la membrana plasmática, cataliza la formación de AMPc a partir de ATP.
- c) El incremento en los niveles de AMPc activa a una proteína cinasa. Esta cinasa es inactiva en ausencia de AMPc. La unión alostérica de este nucleótido estimula a esta proteína.
- d) Dicha proteína fosforila a dos enzimas: la fosforilasa cinasa y la glucógeno sintetasa. La fosforilación de ambas proteínas es la base de la regulación coordinada de la síntesis y degradación del glucógeno. La fosforilación por la proteína cinasa dependiente de AMPc activa a la fosforilasa (indirectamente por activación de la fosforilasa cinasa), y simultáneamente inhibe a la glucógeno sintetasa (directamente). Además, la glucógeno sintetasa también es fosforilada por la fosforilasa cinasa, lo que asegura de este modo que no exista síntesis de glucógeno cuando se está degradando (103 a 105)



**ESQUEMA 8.**

Dos vías de estimulación hormonal de la glucogenólisis: I.- Vía de los fosfoinoitidos-calcio:  $H_1$ , receptor a histamina;  $AT_1$ , receptor a angiotensina;  $\alpha_1$ , receptor alfa 1 adrenérgico; Gp, proteína G acopladora; FLC, fosfolipasa C;  $PIP_2$ , fosfatitilinositol 4,5 bifosfato;  $IP_3$ , inositol 1,4,5 trifosfato; Dg, diacilglicerol. II.- Vía de la adenilato ciclasa:  $\beta_2$ , receptor beta 2 adrenérgico; Gs, proteína G acopladora estimulatoria; AC, Adenilato Ciclasa; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; R, subunidad reguladora de la PC; C, subunidad catalítica de la PC; PC, proteína cinasa AMPc dependiente.

(esquema 8).

El otro mecanismo es el siguiente:

- a) Es activado por hormonas como la epinefrina (a través de la acción  $\alpha_1$  adrenérgica), la angiotensina II (por receptores  $AT_1$ ), y la vasopresina. Estos mensajeros se unen a receptores membranales y a través de una proteína G, activan a la fosfolipasa C (36, 88, 97).
- b) La fosfolipasa C cataliza la formación de  $IP_3$  y diacilglicerol a partir de la hidrólisis del  $PIP_2$ .
- c) El  $IP_3$  libera calcio de reservorios intracelulares, que incrementa su concentración en el citosol (de 0.1 a 1 M). El calcio así liberado se une a una de las subunidades de la fosforilasa cinasa, que corresponde a la calmodulina, proteína de 17 KDa, que sirve como un elemento regulador permanente de la enzima. La unión de calcio induce un cambio conformacional que provoca la activación de la fosforilasa cinasa (106).
- d) Una vez más esta enzima se encarga de fosforilar a la fosforilasa, desencadenándose los pasos ya mencionados que llevan a la degradación de glucógeno (104, 105) (esquema 8).

La fosforilasa es un dímero de 97 KDa, que existe en dos formas interconvertibles: una inactiva (forma b) y otra activa (forma a). La fosforilasa b es convertida a fosforilasa a, por la fosforilación de un residuo de serina en cada subunidad, función realizada por la fosforilasa cinasa (105).

La fosforilasa cataliza reversiblemente la fosforólisis del enlace glucosídico terminal  $\alpha(1\rightarrow4)$  en el extremo no reductor de una cadena lateral del glucógeno, provocando la escisión de la glucosa terminal en forma de glucosa-1-fosfato, la cual es

transformada enzimáticamente en glucosa. Esta se libera al torrente sanguíneo y llega así a los tejidos que la requieren.

## II ANTECEDENTES.

Una de las principales líneas de investigación en el laboratorio a cargo del DR. Jesús Adolfo García-Sáinz, es el estudio de la respuesta adrenérgica en diferentes tipos celulares. Este trabajo ha abarcado desde el reconocimiento de los receptores implicados en dicha respuesta (farmacológico y funcional), los sistemas de transducción acoplados a ellos, hasta el estudio de la propagación intracelular de la señal que lleva a la activación o inhibición de algunas rutas metabólicas.

Una de éstas, la glucogenólisis, resulta ser un modelo adecuado para estudiar la acción de estos agentes. La ventaja que presenta es que puede ser activada por cualquiera de los dos mecanismos de acción hormonal descritos: el de la adenilato ciclasa y el de los fosfoinosítidos-calcio (36, 60, 88, 97). Así se han podido identificar un gran número de tipos y subtipos de receptores que activan esta vía por cualquiera de los dos mecanismos, para ello se han utilizado agonistas y antagonistas selectivos.

Es bien conocido que los agentes  $\alpha_1$  adrenérgicos, la vasopresina y la angiotensina II estimulan la glucogenólisis, la gluconeogénesis, y la ureogénesis en hepatocitos de rata normal a través de un mecanismo asociado con cambios en la concentración de calcio citosólico y con el recambio de fosfoinosítidos. El calcio, el  $IP_3$  y el diacilglicerol son los mediadores de la acción de estas hormonas.

Durante los últimos diez años, los receptores  $\alpha_1$

adrenérgicos han sido objeto de numerosos estudios para comprender su función en el mecanismo al que se acoplan. El modelo más utilizado para esto, es el de las células hepáticas de rata adulta, por presentar en forma predominante la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica (107).

Los estudios recientes de clonación y farmacología del receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, han evidenciado la existencia de dos subtipos de receptores:  $\alpha_{1a}$  y  $\alpha_{1b}$  (9, 10, 80 a 84). Esta división no sólo se fundamenta en un carácter farmacológico, sino también se han propuesto diferencias en los requerimientos de calcio para el desencadenamiento de la respuesta (87 a 90).

Se ha informado que el hepatocito de rata expresa el receptor  $\alpha_{1b}$  adrenérgico (80, 81, 88, 90). Este subtipo estimula la formación de fosfatos de inositol, y moviliza al calcio de los depósitos intracelulares, independientemente del calcio externo.

El efecto del TPA sobre este modelo celular, inhibe la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, al parecer por la fosforilación del receptor (por acción de la PKC), que provoca un cambio en su estado de afinidad por el agonista (60, 61).

Otro de los agentes de interés es la angiotensina II. Su acción sobre la modulación del metabolismo hepático se ha demostrado en varios trabajos. El uso de agonistas selectivos ha permitido demostrar la existencia del subtipo  $AT_1$ , que estimula el recambio de fosfoinosítidos y la activación de la glucogenólisis. A diferencia de lo reportado sobre la inhibición de la respuesta  $\alpha_1$  por TPA, el efecto de la angiotensina II no parece ser afectado por la acción de este compuesto (60).

En el año de 1985, Imoto et al (108) informaron de la

presencia de un gran número de receptores a histamina (del tipo  $H_1$ ), en membranas de hepatocitos de rata. Este receptor, como ya se mencionó, se acopla estimulatoriamente al sistema de los fosfoinosítidos calcio. Sin embargo pocos trabajos se han realizado para comprender su mecanismo de acción sobre el metabolismo hepático.

Como se observa, el conocimiento actual de la regulación hormonal de la glucogenólisis hepática, utilizando como modelo el hígado de rata macho adulta, demuestra la acción de dos vías principales para su activación: una la de la adenilato ciclasa y la de los fosfoinosítidos-calcio. Sin embargo algunos trabajos han demostrado que existen diferencias en la sensibilidad y efectividad para la activación de la glucogenólisis por agentes adrenérgicos en función del sexo (131), la edad (132), la especie (133) y estados patológicos (134). Por ejemplo la respuesta predominante en ratas recién nacidas y juvenes es la  $\beta_2$  adrenérgica. Ya para el estado adulto la respuesta que predomina es la  $\alpha_1$  adrenérgica (132). Estas diferencias también pueden ser observadas cuando se comparan entre diferentes especies: mientras que la respuesta  $\alpha_1$  es predominante en rata, ratón y hamster en el estado adulto, la  $\beta_2$  es mayor en conejo y cuyo (134).

Por otra parte, no únicamente se han observado diferencias en la sensibilidad a los agentes adrenérgicos; también se ha reportado que la vasopresina no induce la glucogenólisis en hepatocitos de conejo, por la ausencia de receptores específicos para este agente (135).

Estos antecedentes y los trabajos recientes, que proponen la existencia de tipos y subtipos de receptores desconocidos para

agentes que activan la glucogenólisis hepática (como lo son los adrenérgicos y la angiotensina II), permitieron proponer el estudio de la acción de tres agentes: los  $\alpha$  adrenérgicos, la histamina y la angiotensina II, en un modelo hepático diferente al de rata y estudiar si la acción de estos agentes pudiera diferir de manera significativa en cuanto al (o a los) tipo(s) o subtipo(s) de receptores que median sus acciones, al sistema de transducción implicado, o a la ruta metabólica activada. Así se inició el presente proyecto utilizando como modelo celular hepatocitos de cuyo macho joven (de 200 a 300 gramos de peso).

En cuanto a los estudios realizados en estas células, se sabe, que la glucogenólisis, mediada por agentes adrenérgicos se realiza a través de receptores  $\beta_2$  y  $\alpha_1$  adrenérgicos, estudios de tipo farmacológico han demostrado la existencia de un gran número de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos ( $4801 \pm 323.08$  fmol/mg), en comparación con los  $\alpha_1$  ( $63.69 \pm 15.26$  fmol/mg) (115- 134).

Aunque se desconoce el subtipo de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico involucrado, se sabe que los agentes  $\alpha_1$ , en hepatocitos de cuyo, activan el recambio de fosfoinosítidos que lleva a la generación del  $IP_3$  y diacilglicerol como segundos mensajeros y a la movilización de calcio de los almacenes intracelulares (109 a 112).



### III OBJETIVOS.

El objetivo general del presente trabajo es analizar el efecto de norepinefrina, histamina y angiotensina II, sobre la activación de la glucogenólisis, en hepatocitos de cuyo, para identificar, farmacológicamente, los tipos y subtipos de receptores implicados, así como el o los sistemas de transducción acoplados a dichos receptores. Además es de gran interés analizar el comportamiento del modelo hepático de cuyo con cada hormona y compararlo con el de rata, para determinar las diferencias y similitudes entre ambos.

Con base en esto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

A) Caracterizar farmacológicamente el subtipo  $\alpha_1$  adrenérgico que participa en la activación de la fosforilasa a.

B) Analizar el efecto del TPA sobre la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica en estas células.

C) Analizar la señal de calcio del sistema.

D) Determinar la existencia de receptores a histamina y caracterizar farmacológicamente el subtipo de receptor.

E) Determinar el mecanismo de acción de la histamina sobre el metabolismo hepático.

F) Caracterizar el receptor a angiotensina II que interviene en la activación de la fosforilasa hepática mediante el uso de antagonistas selectivos.

G) Analizar el efecto del TPA sobre la respuesta a la angiotensina II en hepatocitos de cuyo.

#### IV MATERIALES Y METODOS.

##### Agentes, Reactivos y Compuestos Radiactivos.

1-Epinefrina, 1-norepinefrina, dl-propanolol, histamina, pirilamina, angiotensina II, forbol-12-miristato-13-acetato (TPA), glucosa-1-fosfato, glucógeno, digitonina, cafeína,  $\beta$ -glicerofosfato, piruvato y lactato de Sigma Co. (St. Louis, MO, U.S.A). Prazosina, cloroetilclonidina, 5-metil urapidil, clorfeniramina y ranitidina de Research Biochemicals Inc. (Natick, MA, U.S.A). La metoxamina fue donada de Burroughs Wellcome (Triangle Park, NC, U.S.A). Dup 753, PD 123177 y nifedipina fueron generosamente donados por los Drs. A. Chiu y R.D. Smith (Du Pont, Boston, MA, U.S.A). 2-(2-Aminoetil)-tiazol, cimetidina, impromidina y dimaprit fueron donados por Smith Kline and French (Welwyn Garden, U. K.).  $\alpha$ -D-[U-<sup>14</sup>C] Glucosa-1-fosfato (313 mCi/mmol) fue obtenida de New England Nuclear (Boston, MA, U.S.A). La colagenasa fue de Worthington Biochemical Co (New Jersey U.S.A). Los demás reactivos fueron de la más alta calidad posible.

##### Animales.

Se utilizaron cuyos machos de 200 a 300 gramos de peso, alimentados ad libitum con alimento controlado para roedores de Purina S.A de C.V.

##### Obtención de Células Hepáticas.

Los hepatocitos fueron aislados por el método de digestión con colagenasa de Berry y Friend (113). Esta técnica consiste en

canular la vena porta hepática y perfundir el hígado con un buffer Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), sin calcio a 37 °C, bajo una atmósfera de carbógeno (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) y pH 7.4. Una vez canulado y perfundido el hígado, fue digerido con colagenasa en KRB adicionado de calcio (1.2 mM). La suspensión de células obtenidas fue lavada tres veces en KRB con calcio. La densidad final de la suspensión fue alrededor de 100 mg de células / ml. La viabilidad de las células fue evaluada por la prueba de exclusión de azul de tripan, observadas al microscopio óptico (>95%).

#### Quantificación de la Actividad de la Fosforilasa.

Las células fueron incubadas en un medio estabilizador (KRB con calcio, seroalbúmina de bovino 2.25%, piruvato 1.25 mM y lactato 12.5 mM), en tubos de plástico (10 mg cel/tubo), durante 20 minutos bajo una atmósfera de carbógeno. Al finalizar éste tiempo se adicionaron los agentes a probar y un minuto después se paró la reacción. La actividad de la enzima fosforilasa a se evaluó siguiendo el ensayo descrito por Stalmans y Hers (114), el que se basa en la activación de la enzima por acción hormonal. La fosforilasa a cataliza la degradación del glucógeno a glucosa-1-fosfato in vivo. Bajo las condiciones descritas por estos autores (114), se provocó la reacción inversa midiendo la incorporación de [<sup>14</sup>C]glucosa-1-fosfato a glucógeno. El glucógeno marcado que se obtuvo de esta reacción se cuantificó en un contador de centelleo líquido. Cuando se midió la acción del TPA y de los antagonistas, éstos fueron adicionados a las células 20 minutos antes de realizarse la reacción con los

agentes. La actividad de esta enzima fue expresada en unidades. Una unidad es definida como la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato a producto, en un minuto, por gramo de peso húmedo de las células.

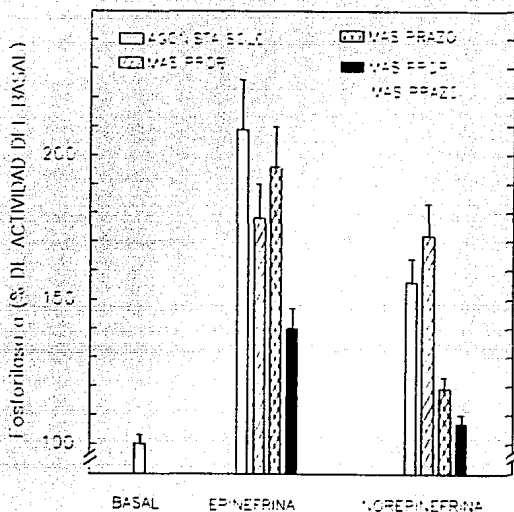
Los datos obtenidos se presentan como el promedio de varios experimentos más / menos el error estándar.

## V. RESULTADOS.

### 1.- ACCION DE AGENTES ADRENERGICOS.

A) Caracterización farmacológica del receptor  $\alpha_1$  adrenérgico, implicado en la activación de la enzima fosforilasa  $\alpha$ .

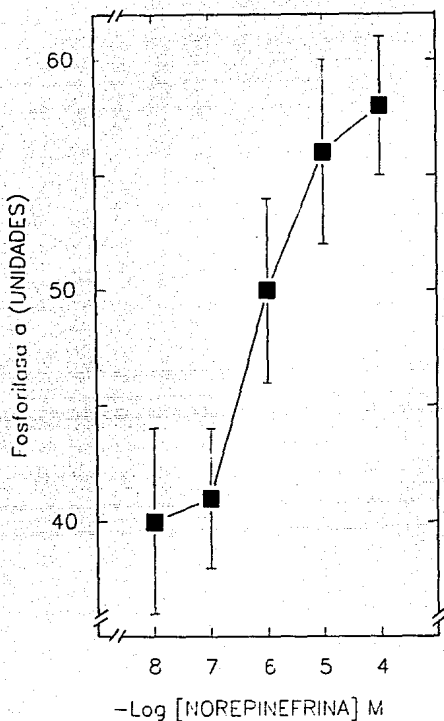
La acción de la epinefrina y norepinefrina fue evaluada sobre la activación de la glucogenólisis. El efecto de ambos mensajeros provocó la activación de la fosforilasa  $\alpha$  (Fig. 1). Como estos agentes se pueden unir a cualquiera de los dos receptores que activan a la fosforilasa, en células hepáticas ( $\alpha_1$  y  $\beta_2$ ), se utilizaron los antagonistas selectivos, prazosina y propranolol. La prazosina es un potente y selectivo antagonista  $\alpha_1$  adrenérgico (69). Por su parte el propranolol es un antagonista adrenérgico que presenta la misma afinidad para los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  (69). A una concentración de  $10 \mu\text{M}$ , permitieron evidenciar la existencia de ambos tipos de receptores. Las diferencias observadas entre la epinefrina y la norepinefrina pueden explicarse por la alta respuesta  $\beta_2$  adrenérgica en estas células (115), y la selectividad de epinefrina para este subtipo de receptor (tabla 1). La acción de norepinefrina fue bloqueada, casi completamente, por  $10 \mu\text{M}$  de prazosina y totalmente por ambos antagonistas (figura 1). En la Figura 2 se muestra que la acción de diferentes concentraciones de norepinefrina, provoca un incremento en la actividad de la fosforilasa, dependiente de la dosis ( $\text{EC}_{50} = 0.9 \mu\text{M}$ ), de la misma forma que lo hace en hepatocitos de rata ( $\text{EC}_{50} = 1 \mu\text{M}$ ) (88).



**FIGURA 1.**

**EFFECTO DE EPINEFRINA, NOREPINEFRINA Y ANTAGONISTAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA.**

Los hepatocitos fueron incubados con  $10 \mu\text{M}$  de epinefrina ó  $10 \mu\text{M}$  de norepinefrina en ausencia o presencia de  $10 \mu\text{M}$  de propranolol y/o  $1 \mu\text{M}$  de prazosina. Los resultados están expresados como el porcentaje de la actividad basal de la fosforilasa a que fue de  $24 \pm 2$  unidades. Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar entre 6 y 8 experimentos.



**FIGURA 2.**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NOREPINEFRINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA.**

Los hepatocitos fueron incubados en presencia de propranolol 10  $\mu$ M y diferentes concentraciones de norepinefrina. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 6 experimentos, por duplicado, expresados en unidades. El nivel basal en ausencia de norepinefrina y propranolol fue de 32 unidades.

Hasta el momento, aún se desconocía el subtipo de receptor adrenérgico implicado. Así se probó el efecto del 5-metil urapidil, un antagonista  $\alpha_{1a}$ . Este agente bloqueó, de una manera dosis dependiente la acción de  $10 \mu\text{M}$  de norepinefrina sobre la actividad de la fosforilasa  $a$ ; el 5-metil urapidil ( $\text{IC}_{50} = 80 \text{ nM}$ ) resultó ser más potente (3 a 10 veces) que la prazosina ( $\text{IC}_{50} = 300 \text{ nM}$ ), ver figura 3.

Uno de los compuestos más efectivos para bloquear la acción de la respuesta  $\alpha_{1b}$  adrenérgica en hepatocitos de rata es la cloroetilclonidina (9, 116), en donde varias concentraciones de este agente causan un decremento progresivo en la máxima estimulación de la fosforilasa inducida por  $10 \mu\text{M}$  de norepinefrina (88). El bloqueo total de la respuesta, en estas células de rata, se alcanzó a una concentración de  $100 \mu\text{M}$  de CEC. En contraste, nuestro estudio demostró que el pretratamiento de los hepatocitos de cuyo con  $100 \mu\text{M}$  de cloroetilclonidina, no tuvo casi efecto sobre la activación de la fosforilasa  $a$ , por concentraciones crecientes de norepinefrina (Fig. 4). Las diferencias observadas en la figura 4 se deben a la gran cantidad de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos, los cuales empiezan a activarse a altas concentraciones de norepinefrina ( $10 \mu\text{M}$ ) a pesar de la presencia de  $10 \mu\text{M}$  de propranolol, el cual es un antagonista competitivo. Esta es una característica propia de nuestro sistema la cual se observa al medir otros parametros bioquímicos. Estos datos y los anteriores demuestran la existencia de un subtipo de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico diferente al reportado en rata.

Para comprobar ésto, se utilizó la metoxamina, un potente agonista  $\alpha_{1a}$ . Sus efectos son casi nulos sobre la activación de



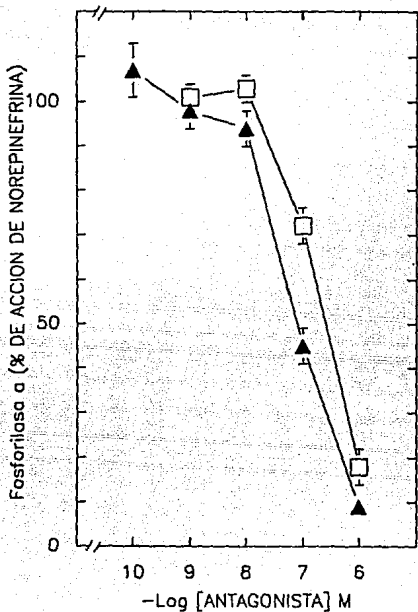
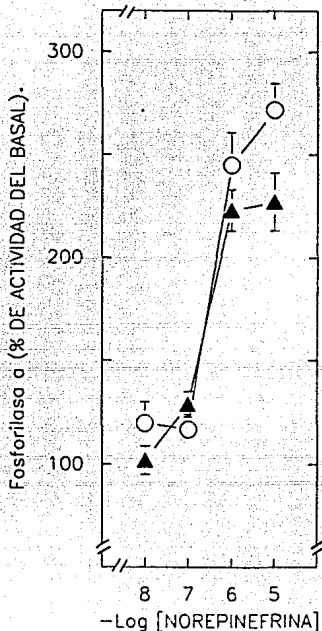


FIGURA 3.

**EFFECTO DE ANTAGONISTAS ALFA 1 ADRENERGICOS SOBRE LA ACTIVACION DE LA FOSFORILASA, INDUCIDA POR NOREPINEFRINA.**

Las células fueron incubadas con 10  $\mu$ M de norepinefrina en presencia de diferentes concentraciones de 5-metil urapidil (triángulos llenos) o prazosina (cuadros vacíos). Los resultados son expresados como el porcentaje de acción de norepinefrina. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de entre 6 y 8 experimentos, por duplicado.



**FIGURA 4.**

**EFFECTO DE CLOROETILCLONIDINA SOBRE LA ACTIVACION DE LA FOSFORILASA POR NOREPINEFRINA.**

Los hepatocitos fueron preincubados en ausencia (círculos vacíos) o presencia (triángulos llenos) de 100  $\mu\text{M}$  de cloroetilclonidina por 15 minutos. Después de la preincubación las células fueron lavadas e incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de propranolol en presencia de diferentes concentraciones de norepinefrina. Los resultados están expresados como el porcentaje de acción de norepinefrina. Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de entre 3 y 4 experimentos por duplicado.

la fosforilasa  $\alpha$  en rata, aún a altas concentraciones de este agente (10 mM) (88). La Figura 5 muestra la activación de la fosforilasa  $\alpha$  en hepatocitos de cuyo, con 10  $\mu$ M de metoxamina (aproximadamente el doble de la actividad basal), lo que sugiere la existencia del subtipo  $\alpha_{1a}$ . El efecto de este agente fue bloqueado casi por completo con 10  $\mu$ M del antagonista,  $\alpha_{1a}$  selectivo, 5-metil urapidil (Fig. 5).

El uso de cada uno de los agentes anteriores, permitió identificar el subtipo  $\alpha_1$  adrenérgico en estas células. A continuación se mostrarán los estudios que se realizaron para identificar el tipo de mecanismo implicado en la señal de calcio.

B) Mecanismo de Acción: Estudio de la dependencia de calcio del sistema y activación de PKC con TPA.

Como se vió, la existencia de 2 subtipos de receptores  $\alpha_1$  no únicamente se basa en un criterio farmacológico sino también se han propuesto diferencias en los requerimientos de calcio (87 a 90).

La figura 6 muestra que en presencia de calcio extracelular, la actividad de la fosforilasa  $\alpha$  por acción de 10  $\mu$ M de norepinefrina, es de aproximadamente 2.5 veces sobre su actividad basal. En contraste, en ausencia de calcio, cuando se adicionó al buffer 25  $\mu$ M de EGTA, la actividad de la enzima no disminuye de forma considerable (se incrementa al doble del basal). Para comprobar si ésta disminución es debida a la activación de canales de calcio sensibles a dihidropiridinas se utilizó la nifedipina. Los datos obtenidos demuestran que la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ , por acción de 10  $\mu$ M de

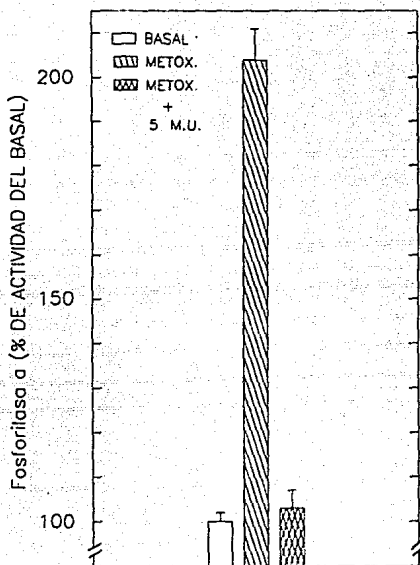
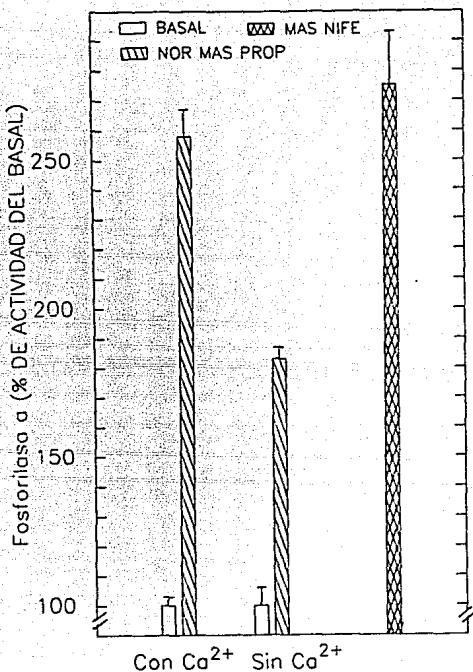


FIGURA 5.

EFFECTO DE METOXAMINA Y EL 5-METIL URAPIDIL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ .

Los hepatocitos fueron incubados con 10  $\mu$ M de metoxamina en ausencia o presencia de 10  $\mu$ M de 5-metil urapidil. Los resultados están expresados como el porcentaje de actividad basal de la fosforilasa  $\alpha$ . Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos por duplicado.



**FIGURA 6.**

**EFFECTO DEL CALCIO EXTRACELULAR Y DE LA NIFEDIPINA SOBRE LA ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ , INDUCIDA POR NOREPINEFRINA.**

Las células fueron incubadas con 10  $\mu\text{M}$  de norepinefrina en un buffer que contenía calcio o en un buffer al que no fue adicionado, suplementado este último con 25  $\mu\text{M}$  de EGTA. También los hepatocitos fueron incubados con 10  $\mu\text{M}$  de propranolol más 10  $\mu\text{M}$  de norepinefrina en buffer con calcio, adicionado con 1  $\mu\text{M}$  de nifedipina. Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad basal de la fosforilasa  $\alpha$ . Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de entre 4 y 6 experimentos por duplicado.

norepinefrina (más  $10 \mu\text{M}$  de propranolol) en presencia de  $1 \mu\text{M}$  de nifedipina en un buffer con calcio, no disminuye (fig. 6). Estos datos demuestran que la estimulación del receptor  $\alpha_{1a}$  en hepatocitos de cuyo no activa el influjo de calcio por este tipo de canales como evento inicial, a diferencia de lo informado en otros sistemas celulares (88).

También se ensayó la sensibilidad a TPA. Los trabajos anteriores demuestran que los ésteres de forbol bloquean la acción  $\alpha_1$  adrenérgica en hepatocitos de rata, al parecer por la fosforilación del receptor, lo que causa un cambio en su estado de afinidad por el agonista (60, 61, 99). El TPA inhibe completamente la glucogenólisis, activada por  $1 \mu\text{M}$  de epinefrina, a una concentración de  $0.1 \mu\text{M}$  en estas células (60). Con éstos antecedentes se iniciaron una serie de experimentos para estudiar la acción del TPA (fig. 7). La activación de la fosforilasa  $a$ , inducida por  $10 \mu\text{M}$  de norepinefrina más  $10 \mu\text{M}$  de propranolol, fue parcialmente inhibida (cerca del 40% de la respuesta), pero sólo con altas concentraciones de TPA ( $1 \mu\text{M}$ ).

## 2.- EFECTO DE AGENTES HISTAMINERGICOS.

A) Caracterización del receptor a histamina que interviene en la activación de la fosforilasa  $a$ .

La histamina estimula de una manera dosis dependiente la glucogenólisis, en hepatocitos de cuyo, al incrementar la actividad de la fosforilasa  $a$ , al doble de su basal (fig. 8); así se comprueba la existencia de receptores a histamina en estas células.

Con el fin de establecer el subtipo de receptor implicado se

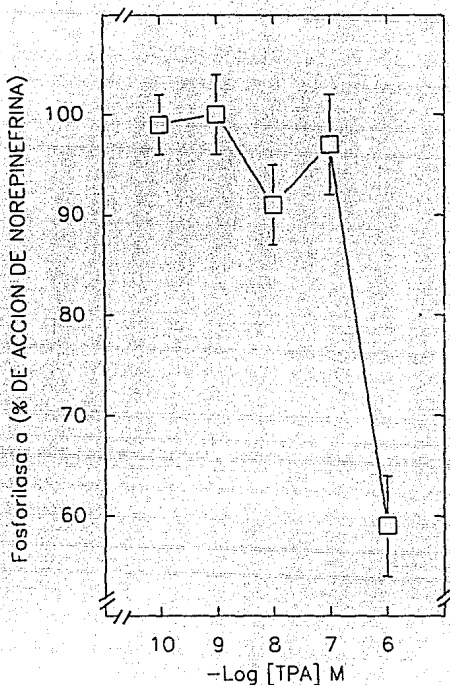


FIGURA 7.

EFFECTO DEL FORBOL 12-MIRISTATO 13-ACETATO (TPA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ , INDUCIDA POR NOREPINEFRINA.

Los hepatocitos fueron incubados con 10  $\mu$ M de propranolol en presencia de 10  $\mu$ M de norepinefrina y diferentes concentraciones de TPA. El propranolol y el TPA fueron a\u00f1adidos a las c\u00e9lulas 20 minutos antes que las hormonas. Al finalizar este tiempo fue adicionada la norepinefrina, que se dej\u00f3 por un minuto. Los resultados est\u00e1n expresados como el porcentaje de acci\u00f3n de norepinefrina. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error est\u00e1ndard de entre 5 y 7 experimentos por duplicado.

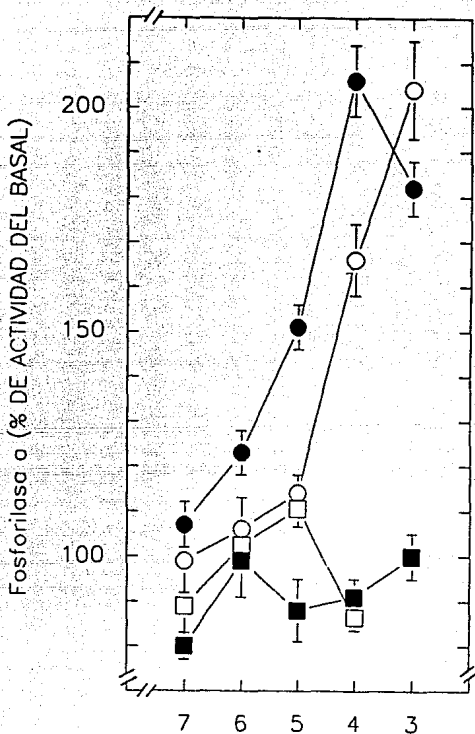


FIGURA 8.

-Log [AGONISTA] M

EFFECTO DE AGONISTAS HISTAMINERGICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ .

Los hepatocitos fueron incubados en presencia de diferentes concentraciones de los siguientes agentes: histamina (círculos llenos); 2-(2-aminoetil)-tiazol (círculos vacíos); dimaprit (cuadros llenos); impromidina (cuadros vacíos). Los resultados están expresados como el porcentaje de la actividad basal de la fosforilasa  $\alpha$ . Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de entre 3 y 4 experimentos por duplicado.



realizaron experimentos con agonistas y antagonistas selectivos para los subtipos  $H_1$  y  $H_2$ . Como se muestra en la figura 8, la acción de los agentes  $H_2$  selectivos, impromidina y dimaprit, no provocan la estimulación de la glucogenólisis aún a concentraciones altas (100 y 1000  $\mu$ M respectivamente). En contraste, el agonista  $H_1$ , 2-(2-aminoetil)-tiazol, un análogo de histamina, incrementó la actividad de la fosforilasa a, aproximadamente al doble de su actividad basal (fig.8). Estos resultados demuestran que la histamina regula la actividad de la fosforilasa a, a través de un receptor  $H_1$ . La histamina mostró mayor potencia en la activación de la enzima ( $EC_{50}$ = 10 nM), que el 2-(2-aminoetil)-tiazol ( $EC_{50}$ = 70 nM), cerca de 10 veces más potente.

Con base en los resultados anteriores, se analizó el efecto de concentraciones crecientes de diferentes agentes antagónicos  $H_1$  y  $H_2$  para corroborar su existencia. Todos estos agentes actúan como inhibidores competitivos, reversibles, de la acción de histamina. La figura 9 muestra la acción de dos potentes antihistamínicos  $H_1$ : la clorfeniramina (una alquilamina) y la pirilamina (una etilenediamina). Como se observa, los 2 compuestos bloquearon la acción de 100  $\mu$ M de histamina sobre la actividad de la fosforilasa a. La clorfeniramina ( $IC_{50}$  =10nM) resultó ser más potente que la pirilamina ( $IC_{50}$ = 300nM). En contraste, la ranitidina y la cimetidina (antagonistas  $H_2$ ), no ejercieron ningún efecto (Figura 9).

La existencia del subtipo  $H_1$  a histamina se demuestra por vez primera en este modelo celular.

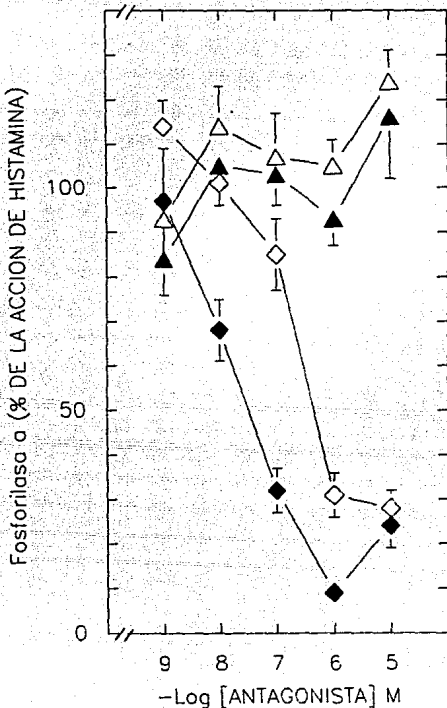


FIGURA 9.

**EFEECTO DE ANTAGONISTAS HISTAMINERGICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ , INDUCIDA POR HISTAMINA.**

Las células fueron incubadas con 100  $\mu$ M de histamina, en presencia de diferentes concentraciones de: clorfeniramina (rombos llenos); pirilamina (rombos vacíos); ranitidina (triángulos llenos), y cimetidina (triángulos vacíos). Los resultados son expresados como el porcentaje de acción de histamina. Los datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de entre 4 y 5 experimentos por duplicado.

B) Posible mecanismo de acción implicado.

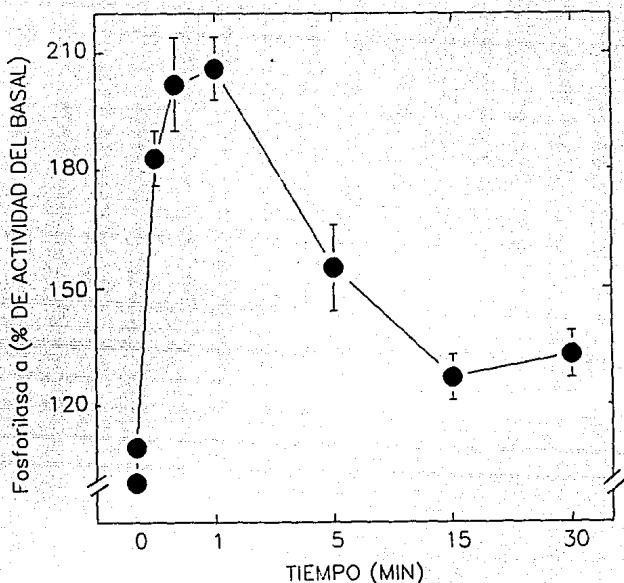
Se ha reportado que el mecanismo de acción al que se encuentra acoplado este subtipo, para la transducción de la señal hormonal, es el de los fosfoinosítidos calcio (35, 37, 92, 93). El rápido incremento en la concentración de calcio intracelular se realiza por efecto del  $IP_3$ , el cual lo libera de reservorios internos.

En la figura 10 se observa que la fosforilasa  $\alpha$  alcanza su máxima actividad, aproximadamente a los 30 segundos, después de agregarse 100  $\mu M$  de histamina, y disminuye su actividad, cerca del 50%, a los 5 minutos. Este comportamiento de la enzima puede estar relacionado con la rápida liberación de calcio de los almacenes intracelulares, cuando el sistema es activado por la hormona, dada la alta sensibilidad que presenta la fosforilasa cinasa para ser activada por calcio. Junto con estos resultados, se encontró en el laboratorio que la acción de la histamina provoca un incremento en la concentración de  $IP_3$  (datos no publicados).

### 3.- ACCION DE LA ANGIOTENSINA II.

A) Caracterización farmacológica del receptor a angiotensina II y mecanismo de acción implicado.

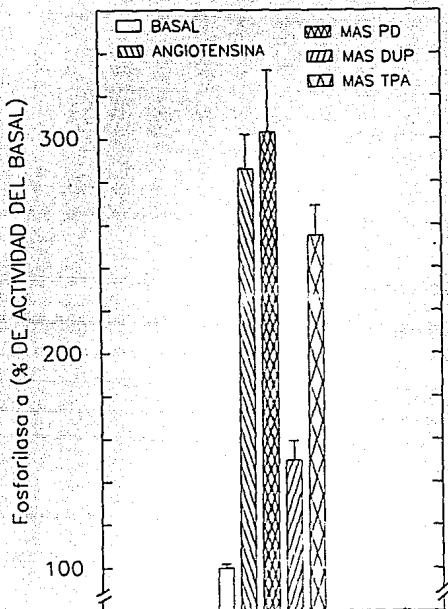
En el presente estudio se caracterizó el receptor a angiotensina II que interviene en la activación de la fosforilasa en hepatocitos de cuyo, por medio de los antagonistas: DUP 753 ( $AT_1$ ) y PD 1223177 ( $AT_2$ ). Ambos compuestos actúan como inhibidores competitivos de los efectos de la angiotensina II (95). En la Figura 11 se presenta la acción de la angiotensina II



**FIGURA 10.**

**CURSO TEMPORAL PARA LA ACTIVACION DE LA FOSFORILASA a INDUCIDA POR HISTAMINA.**

Los hepatocitos fueron incubados con 100  $\mu$ M de histamina para los tiempos indicados. Los resultados están expresados como el porcentaje de actividad basal de la fosforilasa a. Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos por triplicado.



**FIGURA 11.**

**EFFECTO DE ANGIOTENSINA II, ANTAGONISTAS Y FORBOL 12-MIRISTATO 13-ACETATO (TPA) SOBRE LA ACTIVIDAD BASAL DE LA FOSFORILASA  $\alpha$ .**

Los hepatocitos fueron incubados con  $0.1 \mu\text{M}$  de angiotensina II en ausencia o presencia de  $10 \mu\text{M}$  de PD 123177,  $10 \mu\text{M}$  de DUP 753 ó  $1 \mu\text{M}$  de TPA. Los resultados son expresados como el porcentaje de la actividad basal de la fosforilasa  $\alpha$ . Estos datos representan el promedio  $\pm$  el error estándar de 5 experimentos por duplicado.

sobre la actividad de la fosforilasa  $\alpha$ , la cual se incrementa cerca de 2 veces sobre su actividad basal. Para determinar el subtipo de receptor que interviene en este efecto se probaron los 2 antagonistas. Ambos compuestos no mostraron por si mismos acción alguna. Sin embargo 10  $\mu$ M de DUP 753 inhibió aproximadamente el 70% de la respuesta. En contraste, el PD 123177 fue totalmente incapaz de bloquear el efecto de angiotensina a la misma concentración.

Una vez conocido el tipo de receptor que participa en la activación de la fosforilasa, se estudió el efecto del TPA sobre el sistema. Como se observa en la figura 11, la respuesta provocada por la angiotensina II casi no fue afectada por la acción de 1  $\mu$ M de TPA, pues sólo disminuyó en aproximadamente un 20%.

## VI. DISCUSION

### 1.- ACCION DE AGENTES ADRENERGICOS.

Nuestro primer objetivo fue el de caracterizar farmacológicamente el subtipo de receptor  $\alpha_1$  adrenérgico presente en las células hepáticas de cuyo. Una serie de trabajos anteriores, demostraban ya la acción de agentes adrenérgicos implicados en la regulación del metabolismo de éstas células (109 a 112). La acción de agentes  $\alpha_1$  se realiza por la activación del recambio de fosfoinosítidos. En este sistema de transduccción, el calcio, el  $IP_3$  y el diacilglicerol se desempeñan como los mediadores de la acción intracelular. Sin embargo, aún se desconocía el subtipo de receptor que intervenía.

El desarrollo de potentes agonistas y antagonistas, permitió evidenciar una clara diferencia, no únicamente farmacológica, sino también funcional entre los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. Así se determinó la existencia de dos subtipos: el  $\alpha_{1a}$  y el  $\alpha_{1b}$ . (9, 81, 83). Un tercer subtipo, el  $\alpha_{1c}$  fue clonado y expresado recientemente (84).

El subtipo  $\alpha_1$  descrito en hepatocitos de rata es el  $\alpha_{1b}$  (9, 80, 81, 88, 90).

En este estudio nosotros encontramos que la acción, tanto de epinefrina como norepinefrina (ambas más propanolol), estimulan la actividad de la fosforilasa de una manera dosis-dependiente. Se comprobó, de esta manera, la existencia del subtipo  $\alpha_1$  adrenérgico.

Se probó la acción de tres agentes para caracterizar el

subtipo de receptor adrenérgico: el 5-metil urapidil (5-MU), la cloroetilclonidina (CEC) y la metoxamina.

Los estudios realizados por Gross, et al (81, 117) y García-Sáinz (9), demuestran al 5-MU como un buen antagonista de la respuesta  $\alpha_{1a}$  en diferentes modelos celulares. Su acción es inefectiva en el bloqueo de la respuesta adrenérgica en hepatocitos de rata.

Nuestros datos demostraron un comportamiento diferente. El 5-MU inhibe de una manera dosis-dependiente la acción de la norepinefrina, presentando una mayor potencia en el bloqueo que la prazosina. En contraste, en el hígado de rata el 5-MU resultó ser poco efectivo en la inhibición de la respuesta adrenérgica (9).

El otro antagonista utilizado para discernir entre estos subtipos es la CEC. Este agente inhibe irreversiblemente la activación de la respuesta adrenérgica en rata, dada su selectividad para el subtipo  $\alpha_{1b}$  (9, 80, 82, 118). Sin embargo, nuestros datos demostraron que la CEC fue inefectiva para bloquear la acción  $\alpha_1$  adrenérgica.

Tsujimoto et al (88), compararon el efecto de la metoxamina, agonista  $\alpha_{1a}$  selectivo, sobre la activación de la fosforilasa en hepatocitos de rata y aorta de conejo. Sus datos demostraron que la metoxamina tuvo un potente efecto sobre la activación de la enzima en aorta de conejo y un efecto muy pequeño en hepatocitos de rata. Este estudio y otros posteriores, demostraron que en aorta de conejo y en hepatocitos de rata, los subtipos  $\alpha_{1a}$  y  $\alpha_{1b}$ , respectivamente, se encargan de mediar los efectos adrenérgicos (9, 88, 82).



Cuando probamos el efecto de este agente sobre las células de cuyo, la metoxamina se mostró como un efectivo agonista en la activación de la fosforilasa. El máximo incremento de la activación enzimática inducida por metoxamina, fue potencialmente inhibido por el 5-MU, aproximadamente un 95%.

Todos estos datos farmacológicos demuestran la existencia del subtipo  $\alpha_{1a}$  en células hepáticas de cuyo.

Como siguiente objetivo se estudió, en este sistema, la señal de calcio. Han et al (87), propusieron que además de la diferentes propiedades farmacológicas entre estos subtipos, existen diferencias en cuanto a los requerimientos de calcio: mientras que el subtipo  $\alpha_{1b}$  incrementa la formación de fosfatos de inositol y causa una respuesta fisiológica que es independiente del calcio extracelular, el subtipo  $\alpha_{1a}$  provoca la respuesta fisiológica por el influjo de calcio extracelular, a través de canales sensibles a dihidropiridinas. Wilson *et al*(90), posteriormente demostraron el recambio de fosfoinosítidos como un evento secundario.

Al reconocer la existencia del subtipo  $\alpha_{1a}$  en nuestro modelo, se procedió a evaluar el mecanismo de calcio implicado. Aunque parte de la respuesta inducida por norepinefrina más propranolol, disminuye en ausencia de calcio, la nifedipina, una dihidropiridina, no bloqueó la respuesta cuando las células fueron incubadas en presencia de calcio. Estos datos permiten sugerir que el influjo de calcio no se presenta como un fenómeno inicial. Por otra parte, los datos obtenidos en el laboratorio, demostraron además que el incremento de  $IP_3$  y el marcaje de PI, no se afecta considerablemente por la ausencia de calcio

extracelular (119). EL marcaje de PI es un índice del recambio de fosfoinosítidos inducido por hormonas. Estos datos son consistentes con los trabajos de Putney y colaboradores (109 a 112), que han demostrado la activación del recambio de fosfoinosítidos, con la generación de  $IP_3$  como segundo mensajero. Este último lleva a la movilización del calcio de reservorios intracelulares, en estas células. Por lo tanto nuestros resultados demuestran que el receptor  $\alpha_{1a}$  se acopla al recambio de fosfoinosítidos y a la movilización del calcio intracelular, el cual es suficiente sólo para activar a la fosforilasa. Las diferencias observadas en cuanto a la disminución de la respuesta en ausencia de calcio extracelular, se deben probablemente a que los reservorios de calcio intracelular sean insuficientes para mantener la respuesta metabólica, para ello se requiere el influjo de calcio a través de canales insensibles a dihidropiridinas. Varios trabajos apoyan esta idea (120, 121). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha observado que el EGTA disminuye la viabilidad de las células, lo cual pudiera explicar las diferencias observadas.

La acción del TPA presenta un comportamiento muy definido en el modelo de rata. Su activación sobre la PKC, bloquea la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica, probablemente por la fosforilación del receptor, que provoca un cambio en su estado de afinidad por el agonista (60, 61, 99). Sin embargo, estos resultados no son consistentes en aorta de conejo, en donde se expresa el subtipo  $\alpha_{1a}$  en forma predominante. La acción del TPA, en estas células, provoca una inhibición muy pequeña de la respuesta  $\alpha_1$  adrenérgica (122, 123). Nuestros datos demostraron que con altas

concentraciones de TPA (1  $\mu$ M), se inhibe únicamente el 40 % de la respuesta. En contraste, en rata, esta misma concentración inhibe cerca del 90% (60). Esta diferencia en sensibilidad al TPA, probablemente se deban a un efecto postreceptor de la PKC sobre el sistema. Otra explicación, se basa en las diferencias en la estructura primaria de ambos subtipos de receptores. El grupo de Lefkowitz (10, 83), encontró diferencias significativas en la tercera asa citoplasmática del subtipo  $\alpha_{1a}$ , la cual actúa como un sitio importante para la regulación de los subtipos  $\alpha_{1b}$  y  $\alpha_{1c}$ .

## 2.- EFECTO DE AGENTES HISTAMINERGICOS.

Aunque pocos trabajos se han realizado para demostrar la existencia de receptores a histamina en hígado, se ha reportado la existencia de un gran número de receptores  $H_1$  en membranas de hepatocitos de rata (108), confirmado por el estudio de tipo farmacológico y fisiológico realizado por el grupo de García-Sáinz (124), en donde la activación de este subtipo por agentes  $H_1$ , es capaz de regular tres de las principales rutas del metabolismo hepático: glucogenólisis, gluconeogénesis y ureogénesis.

Al carecer de evidencias de la acción de la histamina en células hepáticas de cuyo, se decidió determinar su efecto en la glucogenólisis. El uso del 2-(2-aminoetil)-tiazol, un agonista  $H_1$ , demostró la existencia de receptores a histamina. El efecto de antagonistas selectivos  $H_1$  (clorfeniramina y pirilamina), confirmaron estos resultados.

El estudio del mecanismo de acción de este subtipo, para la

transducción de la señal química, se ha realizado en diferentes modelos celulares (35, 37, 93, 124), en los que se probó que el receptor  $H_1$  se acopla estimulatoriamente al sistema de los fosfoinosítidos-calcio. Datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran la formación de  $IP_3$  en hepatocitos de cuyo, comprobando de esta manera el acoplamiento del receptor  $H_1$  al sistema de los fosfoinosítidos-calcio.

Al estudiar el comportamiento temporal de la fosforilasa, cuando es estimulada con histamina, en presencia de calcio, ésta alcanza su máxima actividad a los 30 segundos, y se decrementa gradualmente hasta los 15 minutos, donde disminuyó cerca del 70 % de la actividad y se mantuvo así hasta los 30 minutos. Es muy probable que este comportamiento se deba a la existencia de dos procesos que intervienen en la activación de la enzima: uno que depende de la rápida movilización de calcio, por acción del  $IP_3$ , que activa completamente a la enzima, y el otro, que depende de la presencia de calcio extracelular para mantener la respuesta sostenida de la enzima (93, 125).

### 3. ACCION DE LA ANGIOTENSINA II.

Algunos trabajos indican, que la angiotensina II, estimula la glucogenólisis, la gluconeogénesis y la ureogénesis en hepatocitos de rata (36, 98, 101, 125).

Hems y colaboradores (97), informaron que este agente vasopresor ejerce sus efectos por un mecanismo independiente de AMPc o GMPc, además encontraron que el calcio desempeña un papel importante en el desencadenamiento de la glucogenólisis. Posteriormente Gunther (98), informó de la presencia del

receptor para la angiotensina en estas células, el cual es sensible a ditiotreitol y se asocia a la movilización de calcio. La activación de este receptor estimula el recambio de fosfoinosítidos, el marcaje de fosfatidilinositol y la activación de la fosforilasa. Esta enzima alcanzó su máxima actividad con  $0.1 \mu\text{M}$  de angiotensina, y su efecto fue bloqueado por  $10 \mu\text{M}$  del antagonista DUP 753 (selectivo para el subtipo  $\text{AT}_1$ ), que inhibe cerca del 90% de la respuesta. Además se observó que el antagonista  $\text{AT}_2$  selectivo (PD 123177), fue incapaz de inhibir el efecto de angiotensina (36). Nuestros datos indican que el efecto de angiotensina en células de cuyo se media de la misma forma que en rata, a través del subtipo  $\text{AT}_1$  sensible a DUP 753. De manera similar la máxima activación de la fosforilasa se alcanzó con  $0.1 \mu\text{M}$  de angiotensina y fue inhibida cerca del 70% de la respuesta con  $10 \mu\text{M}$  de DUP 753. El PD 123177 no provocó ningún bloqueo.

Por otra parte, varios datos no publicados, obtenidos en nuestro laboratorio, indican que la angiotensina II estimula el marcaje de fosfatidilinositol y la formación de  $\text{IP}_3$  en hepatocitos de cuyo, de manera similar a lo encontrado para hepatocitos de rata.

Estudiamos también el efecto del TPA sobre la respuesta a la angiotensina. Aunque la acción del TPA no provoca ningún efecto sobre la respuesta a la angiotensina en hepatocitos de rata (60), decidimos probar si este comportamiento se daba de igual forma en el cuyo. Los resultados demostraron que el TPA provoca una pequeña disminución en la respuesta. Es probable que estas diferencias se deban a un efecto postreceptor de la PKC,

debido a que la respuesta no es inhibida por completo, como sucede con la adrenérgica (60). La acción de la PKC pudiera regular la actividad de alguno de los elementos del sistema, como la proteína o proteínas G acopladas o la fosfolipasa C.

## VII. CONCLUSIONES.

- La epinefrina y la norepinefrina (ambas más propranolol), la histamina y la angiotensina estimulan la glucogenólisis, a través de los subtipos de receptores:  $\alpha_{1a}$ ,  $H_1$  y  $AT_1$ , respectivamente, acoplados estimulatoriamente al recambio de fosfoinosítido y la señal de calcio.

- La movilización de los reservorios intracelulares de calcio por acción del  $IP_3$ , activa a la fosforilasa, requiriéndose para mantener la respuesta el influjo de calcio extracelular.

- La respuesta  $\alpha_{1a}$  adrenérgica mostró una menor sensibilidad a la acción del TPA, posiblemente por la existencia de diferencias en la tercer asa citoplasmática, que actúa como un sitio importante para la regulación del receptor.

- Por otra parte, la respuesta a la angiotensina II también mostró una ligera sensibilidad al TPA. Es probable que ésta sensibilidad se deba a un efecto postreceptor de la PKC sobre el sistema.

## VIII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- García-Sáinz, J.A. (1987) en: Mensaje Bioquímico. Vol.X.pp 127-210.
- 2.- Kleinsmith, J.L., Kish, V.M. (1989). Principles of Cell Biology. Harper & Row, Pub. N.Y. pp 619-642.
- 3.- García-Sáinz, J.A. (1987). Hormonas: Mensajeros Químicos y Comunicación Celular. F.C.E., S.E.P., México. 108p.
- 4.- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1989). Molecular Biology Of The Cell. Gerland, Pub. Inc. N.Y. pp 681-726.
- 5.- Snyder, S.H. (1985). Sci. Amer. 253 (4): 114-123.
- 6.- Stryer, L. (1988). Biochemistry. W.H. Freeman and Company. N.Y. pp 975-1004.
- 7.- Bockaert, J. (1985). Mundo Científico. 6: 960-968.
- 8.- Hollenberg, M.D. (1988) en Williams, M., Glennon, R.A., Timmermans, P.B.M.W.M. (Eds.). Receptor Pharmacology and Function. MerceL, Dekker, Pub., N.Y. pp 1-16.
- 9.- Torres-Márquez, M.E., Villalobos-Molina, R., García-Sáinz, J.A. (1991). Eur. J. Pharmacol. 206: 199-202.
- 10.- Lomasney, J.W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W.Y., Schwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1991). J. Biol. Chem. 266: 6365-6369.
- 11.- Buschaver, A., Schunack, W., Arrang, J.M., Garbag, M., Schwartz, J. Ch., Young, J.M. (1988) en Williams, M., Glennon, R.A., Timmermans, P.B.M.W.M. (Eds). Receptor Pharmacology and Function. MerceL, Dekker, Pub. N.Y. pp 203-347.



- 12.- Czech, M.P., Klarlund, J.K., Yagaloff, K.A., Bradford, A.P., Lewis, R.E. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 11017-1120.
- 13.- Strange, P.G. (1988). *Biochem. J.* 249: 309-318.
- 14.- Rall, T.W., Sutherland, E.W., Berthet, J. (1957). *J. Biol. Chem.* 224: 464.
- 15.- Sutherland, E.W. (1972). *Science.* 177: 401-408.
- 16.- Greiner, C., Jakobs, K.H. (1988). *Biochem. J.* 254: 27-31.
- 17.- Shirakawa, F., Yamashita, V., Chedid, M., Mizel, S.B., (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8201-8205.
- 18.- Kanof, P. D., Greengard, P. (1979). *Mol. Pharmacol.* 15: 445-461.
- 19.- Nair, B.G., Rashed, H.M., Patel, T.B. (1989) *Biochem. J.* 264: 563-571.
- 20.- Robdell, M. (1980). *Nature.* 284: 17-22.
- 21.- Birnbaumer, L. (1990). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 675-705.
- 22.- Spiegel, A.M. (1990), en Nahorski, S.R. (Ed.). *Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development.* Wiley-Interscience Pub. England. pp.31-41.
- 23.- Gilman, A.G. (1984). *J. Clin. Invest.* 73: 1-8.
- 24.- García Sainz, J.A. (1985). *Ciencia.* 36: 97-103.
- 25.- Neer, E.J., Clapham, D.E. (1988). *Nature.* 333: 129-134.
- 26.- Jakobs, K.H. (1979). *Mol. Cell. Endocrinol.* 16: 147.
- 27.- Reagan, J.W., Nakata, H., De Marinis, R.H., Caron. M.G., Lefkowitz, R.J. (1986). *J. Biol. Chem.* 261: 3894-3900.
- 28.- Hepler, J.R., Huges, A.R., Harden, T.K. (1987). *Biochem. J.* 247: 793-796.

- 29.- Amlaiky, N., Caron, M. G. (1985). J. Biol. Chem. 260: 1983-1986.
- 30.- Hokin, M.R., Hoking, L.E. (1953). J. Biol.Chem. 203:967-977.
- 31.- Berridge, M.J. (1985). Sci. Amer. 253 (4): 124-134.
- 32.- Fain, J. N. García- Sainz, J.A. (1980). Life. Sci. 26: 1183-1194.
- 33.- Villalobos- Molina, R., Uc, M., Hong, E., García- Sainz, J.A. (1982). J. Pharmacol. Exp. Ther. 222: 258.
- 34.- García- Sainz, J.A. (1987). Cir. Res. Suppl.II 61:II-1-II-5.
- 35.- Raymond, J.R., Albers, F.J., Middleton, J.P., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Oberd, L.M., Dennis, V.W, (1991).J. Biol. Chem. 266: 372-379.
- 36.- García- Sainz, J.A., Macías- Silva, M., (1990). Biochem. Biophys. Res. Commun. 172: 780-785.
- 37.- Villalobos-Molina, R., García-Sainz, J.A. (1983). Eur. J. Pharmacol. 90: 457-459.
- 38.- Inagaki, N., Fukui, H., Ito, S., Yamatodani, A., Wada, H. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 4215-4219.
- 39.- Weiss, S.J., Putney, J.W. (1981). Biochem. J. 194: 463-468.
- 40.- Michael, R.H., (1975) Biochem. Biophys. Acta. 415: 81.
- 41.- Berridge, M.J. (1984). Biochem. J. 220: 345-360.
- 42.- Berridge, M.J. (1987). Ann. Rev. Biochem. 56: 159-193.
- 43.- Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1988). J. Biol. Chem. 263: 4993-4996.
- 44.- García- Sainz, J.A. (1991). NIPS. 6: 196-173.
- 45.- Litosch, I., Wallis, Ch., Fain, J.F. (1985). J. Biol. Chem. 260: 5464-5471.
- 46.- Taylor, S.J., Exton, J.H. (1987). Biochem. J. 248: 791-799.

- 47.- Boyer, J. L., Downes, P.C., Harden, T.K. (1989). J. Biol. Chem. 264: 884-890.
- 48.- Smrcka, A.V., Hepler, J.R., Brown, K.O., Sternweis, P.C. (1991). Science. 251: 804-807.
- 49.- Taylor, S.J., Exton, J.H. (1991). FEBS. Lett. 286: 214-216.
- 50.- Taylor, S.J., Chae, Z.H., Rhee, S.G., Exton, J.H. (1991). Nature. 350: 516-518.
- 51.- Wange, R.L., Smarcka, A.V., Sterweis, P.C., Exton, J.H. (1991). J. Biol. Chem. 266: 11409-11412.
- 52.- Rhee, S.G., Suh, P.G., Lee, S.Y., Ryu, S.H. (1989). Science. 244: 546-550.
- 53.- Rasmussen, H. (1989). Sci. Amer. 261 (4): 66-73.
- 54.- Nishizuka, Y., (1988). Nature. 334: 661-665.
- 55.- Nishizuka, Y., (1988). Science. 233: 305-312.
- 56.- Ter Bush, D.R., Bittner, M.A., Holz, R.W. (1988). J. Biol. Chem. 263: 18873-18879.
- 57.- Ho, A.K., Thomas, T.P., Chik, C.L., Anderson, W.B., Klein, D.C. (1988). J. Biol. Chem. 263: 9292-9297.
- 58.- Kashimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, V., Nishizuka, Y. (1980). J. Biol. Chem. 255: 2273-2276.
- 59.- Hernández-Sotomayor, S.M.T., García-Sáinz, J.A. (1988). Biochem. Biophys. Acta 968: 138-141.
- 60.- Corvera, S., García-Sáinz, J.A (1984). Biochem. Biophys Res. Commun. 119: 128-133.
- 61.- García-Sáinz, J.A., Mendlovic, F., Martínez-Olmedo, A. (1985). Biochem. J. 228: 277-280.
- 62.- Bell, J. D., Buxton, I.L.O., Brunton, L.L. (1985). J. Biol. Chem. 260: 2625-2628.

- 63.- Nabilka, T., Nara, Y., Yamori, Y., Lovenberg, W., Endo, J. (1985). *Biochem. Biophys Res. Commun.* 131: 30-36.
- 64.- Kelleher, D.J., Pessin, J.E., Ruoho, A.E., Johnson, G.L. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:4316
- 65.- Jakobs, K.H., Baver, S., Watanabe, Y. (1985). *Eur. J Biochem.* 151: 425-430.
- 66.- Katada, T., Gilman, A. G., Watanabe, Y., Baver, S., Jakobs, K.H. (1985). *Eur. J. Biochem.* 151: 431-437.
- 67.- Gutiérrez-Venegas, G., García-Sáinz, J.A. (1991). *FEBS. Lett.* 279: 316-318.
- 68.- Gosovski, F., Gutkind, J. S. (1991). *Mol. Pharmacol.* 39:124-129.
- 69.- Hoffman, B.B, Lefkowitz, R. J. (1990). en Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P.(Eds). *Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of therapeutics.* 8th. Ed. Pergamon Press. pp 187-220.
- 70.- Wilson, J.D., Foster, D.W. Eds. (1985). *Textbook of Endocrinology.* Saunders, Ed.
- 71.- Morton, I.K.M., Halliday, J. (1981). En: G Kunos, (ed). *Adrenoceptor and Catecholamine Action.* Wiley-Interscience. Pub. Montreal. pp 1-68
- 72.- Robinson, G.A., Butcher, R. W., Sutherland, E. W., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 139: 703-723. (1967)
- 73.- Shorr, R. G. L., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1981). *J.Biol. Chem.* 256: 5820-5826.
- 74.- Shorr, R. G. L., Strohsacker, M.W., Lavin, T.N., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. (1982) . *J. Biol. Chem* 257: 12341-12350.
- 75.- Levitzki, A. (1988). *Science.* 241: 800-806.

- 76.- Strader, C.D., Dixon, R.A.F., Cheung, A.H., Candelore, M.R., Blake, A.D., Sigal, I.S. (1987). *J. Biol. Chem.* 262:16439-16443.
- 77.- Regal, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1990) en: S.R., Nahorski (Ed). *Transmembrane Signalling, Intracellular Messenger and Implications for Drug Development.* Wiley Interscience Pub. England. pp. 1-9.
- 78.- Langer, S.Z. (1977). *Br. J.Pharmacol.* 60: 481-497.
- 79.- Timmermans, P.B.M.W.M. (1986) en: M.Williams, R.A. Glennon, P.B.M.W.M. Timmerman (Eds). *Receptor Pharmacology and Function.* Merce! Dekker. N.Y. pp. 173-205.
- 80.- Minneman, K.P., Han, Ch., Abel, P.W. (1988). *Mol. Pharmacol.* 33:509-514
- 81.- Gross, G., Hanft, G., Rugevics, Ch. (1988). *Eur. J. Pharmacol.* 151: 333-335.
- 82.- Tian, W.N., Gupta, S., Deth, R.C. (1990). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 877-883.
- 83.- Cotecchia, S., Schwinn, D.A., Randall, R.R., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Kobilka, B.K. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 7159-7163
- 84.- Schwinn, D.A., Lomasney, J.W., Lorenz, W., Szklut, P.J., Freneau, R.T., Yang-Feng, T.L., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Cotecchia, S. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 8183-8189.
- 85.- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.L., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G. Lefkowitz, R.J., Regan, J.W. (1987). *Science.* 238:650.
- 86.- Byund, D.B. (1988). *Trends Pharmacol. Sci.* 9: 356-361.

- 87.- Han, Ch., Abel, P.W., Minneman, K.P. (1987). *Nature* 329: 333-335.
- 88.- Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, E., Hashimoto, K. (1989). *Mol. Pharmacol* 36: 166-176.
- 89.- Michel, M.C., Hanft, G., Gross, G. (1990). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 341: 385-387.
- 90.- Wilson, k., Minneman, K.P. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 17601-17606.
- 91.- Garrison, J.C. (1990). en A. G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor (Eds). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pargamon Press, N.Y. pp 574-599.
- 92.- Timmerman, H. (1991). *Acta Otolaryngol. Suppl.* 479:5-11.
- 93.- Brown, R.D., Prendiville, P., Cain, C. (1986). *Molec. Pharmacol* 29:531-539.
- 94.- Arrang, J.M., Gargarg, M., Lancelot., J.C., Lecomte, J.M., Pollard, H., Robba M., Schunack, W., Schwartz, J.C. (1987). *Nature.* 327:117-123.
- 95.- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F. (1991). *Trends. Pharmacol. Sci.* 12:55-62.
- 96.- Vander, A.J. (1986). *Fisiología Renal*. Mc Graw Hill. México. 238 p.
- 97.- Hems, D.A., Rodríguez, L., Whitton, P.D. (1978). *Biochem. J.* 172: 311-317.
- 98.- Gunther, S. (1984). *J. Biol. Chem.* 259:7622-7629.
- 99.- García-Sáinz, J.A., Tussié-Luna, Ma.I., Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1986). *Biochem. Biophys. Acta.* 887: 69-72.

- 100.- Sumner, C., Tang, W., Zelezna, B., Raizada, M. (1991).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 7567-7571.
- 101.- García-Sáinz, J.A., Hernández-Sotomayor, S.M.T. (1985).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 6727-6730.
- 102.- Gutman, A. (1984) en: Riuka, B. (Ed). Regulation of  
Carbohydrate Metabolism. Vol. II. CRC. Press, pp 33-52.
- 103.- Birnbaum, M.J., Fain, J.N. (1977). J. Biol Chem. 252:528-  
533.
- 104.- Heilmeyer, Jr., Ludwig, M.G. (1986) en: Heilmeyer, L.M.G.  
(Ed). Signal Transduction and Protein Phosphorylation.  
NATO ASI Series. N.Y. pp 17-30.
- 105.- Madzen, N.B. (1986). en: Boyer, P.D., Krebs, E.G. (Eds).The  
Enzymes.Vol XVIII. Academic Press.Inc. USA. pp 365-394.
- 106.- Pickett-Gies, CH.A., Walsh, D.A. (1986). en: Boyer, P.D.,  
Krebs, E.G. (Eds). The Enzymes. Vol. XVII. Academic Press.  
Inc. USA. pp 395-459.
- 107.- Corvera, S., Huerta-Baena, J., García-Sáinz, J.A. (1982).  
Eur.J.Pharmacol. 82:89-91.
- 108.- Imoto, M., Tsuchie, K., Tanaka, M., Sugiyama, S., Ozawa, T.  
(1985). Biochem. Biophys. Res.Comm. 127: 885-889.
- 109.- Haylett, D.G., Jenkinson, D.H. (1972). J. Physiol. 225:751-  
772.
- 110.- Burgess, G.M., Godfrey, P.P., Mckinney, J.S., Berridge,  
M.J., Irvine, R.F., Putney, J.W. (1984). Nature. 309:63-66.
- 111.- Burgess, G.M., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Mc Kinney, J.S.,  
putney, J.W. (1984). Biochem. J. 224: 741-746.
- 112.- Burgess, G.M., Mckinney, J.S., Irvine, R.F., Putney, J.W.  
Biochem. J. (1985). 232: 237-243.

- 113.- Berry, M.N., Friend, D.S. (1969). J.Cell.Biol. 43: 506-
- 114.- Stalmans, W., Hers, H.G. (1975). Eur.Biochem. 54: 341-350.
- 115.- Arinze, I.J., Kawai, Y. (1983). Arch. Biochem. Biophys. 225: 196-202.
- 116.- Han, Ch., Wilson, K.M., Minneman, K.P. (1990). Mol. Pharmacol. 37: 903-910.
- 117.- Hanft, G., Gross, G. (1989). Br. J. Pharmacol. 97:691-700.
- 118.- Han, Ch., Wilson, K. M., Minnerman, K.P. (1990). Mol. Pharmacol. 37: 903-910. (119).
- 119.- García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, Ma.T., Olivares-Reyes, J.A., Macías-Silva, M. En Revisión. (J. Biochem).
- 120.- Dewitt, L.M., Putney, J.W.Jr. (1983). FEBS Lett. 160:259-263.
- 121.- Dewitt, L.M., Putney, J.W.Jr. (1984). J. Physiol. 346: 395-407.
- 122.- García-Sáinz, J.A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Baena, J., Tsujimoto, G., Hoffman, B.B. (1985). Eur. J. Pharmacol. 122: 393-397.
- 123.- Villalobos-Molina, R., Ransanz, V., Torres-Márquez, M.E., Hong, E., García-Sáinz, J.A. (1990). Biochem. Biophys. Res. Comm. 171: 618-624.
- 124.- García-Sáinz, J.A., De la Garza, Ma.C., Contreras-Rodríguez, J.L., Najera-Alvarado, A. (1987). Mol. Pharmacol. 31: 253-258.
- 125.- Joseph, S.K., Coll, K.E., Thomas, A.P., Rubin, R., Williamson, J.R. (1985). J. Biol. Chem. 260: 12508-12515.



- 126.- Dolphin, A. C. (1990), en: Houslay, M.D., Milligan, G. (Eds). G Proteins as Mediators of Cellular Signalling Processes. Wiley Ed. pp 125-150.
- 127.- Putney, J. W. Jr. (1987), en: R. R. Jr. Ruffolo (Ed). The alpha-1-Adrenergic Receptors. Humana. Clifton, N. Jersey. pp 189-205.
- 128.- Lefkowitz, R. J., Hoffman, B. B., Taylor, P. (1990), en: Gilman, A. G., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (Eds). Goodman and Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th. Pergamon Press Ed. pp 84-121.
- 129.- Dohlman, H. G., Caron, M.G., Lefkowitz, R. J. (1987). Biochemistry. 26: 2657-2664.
- 130.- Chan, T. M., Exton, J. H. (1978). J. Biol. Chem. 253: 6393-6400
- 131.- Studer, R. K., Borle, A. B. (1982). J. Biol. Chem. 257: 7987-7993.
- 132.- Blair, J. B., James, M. E., Foster, J. L. (1979). J. Biol. Chem. 254: 7579-7584.
- 133.- Ulakhe, S. J., Pulga, V. B., Tran, S. (1988). Molec. Cell. Biochem. 83: 81-88.
- 134.- García-Sáinz, J. A., Alcántara, R., Hernández-Sotomayor, S. M. T., Mas-Oliva, J. (1989). Life Sci. 44: 1767-1775.
- 135.- Vanderkerckhove, A., Miot, F., Keppens, S., De Wulf, H. (1989). Biochem. J. 259: 609-611.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA