

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DEL RECEPTOR  $\alpha_{1B}$   
ADRENERGICO EN HEPATOCITOS DE RATON



EXAMENES PROFESIONALES.  
FAC. DE QUIMICA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGICA  
P R E S E N T A  
PATRICIA CASAS GONZALEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994





## **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.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>PROF. GUADALUPE VELEZ PRATT</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>PROF. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>PROF. HOMERO HERNANDEZ MONTES</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>PROF. LAURA PENICHE VILLALPANDO</b>
<b>2do. SUPLENTE:</b>	<b>PROF. MARINA GAVILANES RUIZ</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**INSTITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR. UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**



---

**DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ**

**SUSTENTANTE:**



---

**PATRICIA CASAS GONZALEZ**

El presente trabajo fue apoyado para su realización por donativos de CONACyT (0310-N9107) y de la DGAPA (IN200193).

*A MIS PADRES: PEDRO Y VENTURA  
Para cada uno tengo una infinidad de  
cosas que agradecer, especialmente que  
con su apoyo y confianza, me  
ayudaron a lograr esta meta.*

*A MIS HERMANOS: GLORIA, ISABEL,  
EDUARDO Y MARTÍN*

*Con cariño, por todos los momentos  
compartidos y ese apoyo silencioso que  
sin valorar en su momento utilice.*

A XIMENA Y DANIELA  
Con especial cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Adolfo García-Sáinz mi más sincero agradecimiento por la dirección de este trabajo y por el apoyo que me ha brindado.

A Mary Tere Lara por su continuo apoyo, por su compañía y por su invaluable amistad.

A Gonzalo de Allende y Rocío Alcántara por compartir conmigo el trabajo, su tiempo y amistad.

A Claudia González y Tere Romero por su colaboración en este trabajo.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio: Tere Lara, Rocío Alcántara, Marina Macías, Gloria Gutiérrez, Marta Robles, Claudia González, Tere Romero, Alberto Olivares y Gonzalo de Allende, por compartir conmigo su formación académica, su amistad y por toda la ayuda brindada en el trabajo diario.

A los miembros del jurado por la revisión del presente trabajo.

A Lupita Jiménez por realizar incansablemente su trabajo, facilitando así el nuestro.

## INDICE

INTRODUCCION .....	1
OBJETIVOS .....	31
MATERIALES Y METODOS .....	32
RESULTADOS .....	40
DISCUSION .....	53
CONCLUSIONES .....	59
BIBLIOGRAFIA .....	60

## INTRODUCCION

Los sistemas vivientes contienen moléculas muy grandes y complejas que funcionan conjuntamente en forma coordinada, estos atributos se deben en gran parte a las propiedades químicas de sus constituyentes principales.

La compleja organización fisicoquímica de la vida hace posible un buen número de procesos fundamentales que se llevan a cabo en forma organizada y regulada en todos los sistemas vivientes. La primera de estas propiedades es producto de la organización química y de las actividades enzimáticas de la materia viva. Una segunda propiedad peculiar de la vida es su capacidad de reproducción, ya que cada tipo de organismo vivo es capaz de producir nuevos individuos, que esencialmente, son duplicados de él. La tercera característica de todos los sistemas vivos es la capacidad de adaptación, o sea, de un continuo ajuste regulado a las condiciones de un mundo en perpetuo cambio. Todos los organismos tienen cierta capacidad para mantener las actividades vitales, efectuando modificaciones que permiten el ajuste a cambios repentinos en el medio ambiente. Las respuestas a corto plazo, reguladas internamente, a estímulos o cambios del medio externo son formas de adaptabilidad. Tales adaptaciones de estímulo-respuesta ajustan al ser vivo según el flujo de las circunstancias externas.

Todas las criaturas vivas están formadas por células, las formas más simples de vida son organismos unicelulares que se propagan dividiéndose en dos, mientras que los organismos superiores, son como ciudades celulares. Una de las grandes ventajas de la pluricelularidad estriba en que confiere a las células la libertad de especializarse de una manera tal que sería incompatible con la supervivencia en aislamiento, pero que es beneficiosa para el organismo en conjunto. Así, todos los organismos pluricelulares tienen dos rasgos esenciales: sus células se especializan y cooperan.

Mediante la especialización y la cooperación, las células se combinan formando un único organismo coordinado, con mayores capacidades que cualquiera de las partes que lo componen.

La evolución de los organismos pluricelulares ha dependido de la capacidad de las células de comunicarse entre ellas. La comunicación entre las células es necesaria para regular su desarrollo y su organización formando tejidos, para controlar su crecimiento y su división y para coordinar sus diversas actividades. La importancia y complejidad de la comunicación intercelular en los animales superiores sugiere que una gran proporción de los genes de estos organismos está dedicada a estos procesos. Existen varios tipos de comunicación celular, uno de los más ampliamente difundidos en la naturaleza es la comunicación química, dicha comunicación se coordina y realiza principalmente por medio de dos sistemas: el sistema nervioso y el sistema hormonal o endócrino los cuales operan básicamente por medio de señales químicas, estas señales reciben el nombre de mensajeros químicos que se originan a partir de células emisoras y tienen la capacidad de alterar el funcionamiento de otra u otras, llamadas células blanco. Las células emisoras pertenecen a su vez a las células endócrinas y células nerviosas las cuales están altamente especializadas en la señalización química, y actúan conjuntamente coordinando las diversas actividades de las células que conforman un organismo. Es así como estos dos importantes sistemas convergen en uno mismo: el sistema neuroendócrino (1). Las células nerviosas transmiten la información con mucha mayor rapidez que las células endócrinas, ya que para transportar la información a grandes distancias generan impulsos eléctricos que transmiten rápidamente la señal a lo largo de las prolongaciones nerviosas, transformándose dichos impulsos eléctricos en señales químicas. Mientras que las células endócrinas liberan la señal al torrente circulatorio, a través del cual llega a sus células blanco.

Se han establecido diversos criterios que permiten identificar las diferentes estrategias de la señalización química, así los mensajeros químicos pueden dividirse en tres distintas clases generales de acuerdo a su mecanismo de distribución (2): 1) **mediadores químicos locales o autacoides**, que son rápidamente absorbidos o destruidos de tal forma que sólo actúan sobre células de las proximidades inmediatas (comunicación parácrina), o sobre ellas mismas (comunicación autócrina); 2) **hormonas**, que son liberadas por las células que conforman las glándulas de secreción interna, estas viajan a través del torrente sanguíneo e influyen sobre células ampliamente distribuidas en todo el cuerpo (comunicación endócrina) y 3) las células nerviosas forman uniones especializadas (sinapsis química) con células sobre las que influyen, segregando mediadores químicos de muy corto alcance denominados **neurotransmisores**, la célula "emisora" de una sinapsis es llamada célula presináptica y la célula sobre la que actúa el neurotransmisor se denomina célula postsináptica.

Los mensajeros químicos se clasifican también en tres clases de acuerdo a su naturaleza química (1), mediante la cual cada mensajero determina la forma en que operan bioquímicamente, especialmente la interacción con sus células blanco:

1) **Mensajeros de origen lipídico**, entre los que se encuentran las hormonas esteroides y las prostaglandinas; las primeras se sintetizan a partir del colesterol y se piensa que estas se acumulan en el núcleo donde ejercen su acción a nivel de la transcripción.

2) **Mensajeros de naturaleza peptídica**, son moléculas hidrosolubles entre los que se incluyen algunas hormonas proteicas y los factores de crecimiento

3) **Aminas**, dentro de estos hay algunos aminoácidos como el glutámico, el aspártico y la glicina y algunos productos del metabolismo de los aminoácidos como las hormonas tiroideas, la adrenalina y la dopamina, que juegan un importante papel como mensajeros.

Estas características originan una diferencia importante entre las moléculas de señalización que estriba en el intervalo de tiempo que permanecen en la corriente sanguínea o en los líquidos tisulares: las hormonas hidrosolubles generalmente se eliminan y/o degradan a los pocos minutos de penetrar en la sangre, y los mediadores químicos locales y neurotransmisores se eliminan con rapidez aún mayor; en cambio las hormonas hidrofóbicas persisten en la sangre durante horas y algunas durante días, a excepción de las prostaglandinas y tromboxanos que actúan como mediadores locales durante señales parácrinas y son destruidos cerca de su sitio de síntesis; por esto los mensajeros químicos hidrosolubles suelen mediar respuestas de corta duración, mientras que los hidrofóbicos median respuestas más duraderas.

La discrepancia de solubilidad en los mensajeros químicos da lugar a una diferencia fundamental en el mecanismo a través del cual estas moléculas influyen sobre las células blanco, así la capacidad de una célula para responder a una molécula de señalización extracelular determinada depende de la presencia de unas proteínas específicas denominadas **receptores**, moléculas capaces de reconocer e interaccionar con el mensajero, y finalmente transmitir el mensaje para que se produzca la respuesta de la célula. Las moléculas de señalización hidrofóbicas se unen a proteínas transportadoras específicas, mediante las cuales viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar a la célula blanco y una vez separadas de sus proteínas transportadoras, pueden atravesar fácilmente la membrana plasmática de las células donde ejercerán su acción al unirse a receptores específicos intracelulares ya sea en citoplasma o en núcleo. Por otra parte los mensajeros de naturaleza hidrofílica no pueden pasar directamente a través de la bicapa lipídica, en vez de ello se unen a receptores específicos situados en la superficie celular.

Las células nerviosas y las células endócrinas dirigen sus moléculas de señalización hacia las células blanco a través de vías

muy diferentes y la especificidad de la respuesta depende completamente de la presencia o no en la célula de receptores para cada hormona. En los animales adultos, la mayoría de las células están especializadas en la realización de una función primaria y poseen una colección característica de receptores que les permite responder a cada una de las diferentes señales químicas que desencadenan o modulan esta función. El presente trabajo se referirá en forma exclusiva a los receptores localizados en la membrana plasmática.

La idea del receptor surgió en 1906, cuando Langley (3) estudiaba la unión mioneuronal para establecer el mecanismo activo de la nicotina y del curare y desentrañar la relación antagónica que se producía entre estos agentes, que parecían competir por el mismo sitio de unión.

Los receptores son proteínas de alto peso molecular que cumplen dos procesos fundamentales: 1) reconocer y unir al mensajero químico y 2) transmitir el mensaje al interior de la célula.

La unión de la hormona al sitio del receptor es altamente específica debido a su complementaridad estereoquímica, es decir, se lleva a cabo con alta afinidad y selectividad. Dicha interacción es rápida y reversible. La velocidad de asociación y disociación del complejo hormona-receptor dependen de la influencia que ejercen algunas variables como son la temperatura y el pH.

Por los estudios realizados acerca de los receptores se sabe que el número de éstos en una célula, para un mensajero dado es limitado y por lo tanto la unión es saturable, sin embargo, un mensajero químico puede ser reconocido no por un sólo tipo, sino por diversos receptores, ya que se ha demostrado que ciertamente existe una variedad de receptores para una misma hormona en un mismo tejido.

Los receptores además de unir al mensajero natural, pueden unir agentes farmacológicos capaces de bloquear al receptor, a los que se ha llamado antagonistas, o bien activarlo, y entonces se les llama agonistas, así con base en el orden de afinidad que presentan los diferentes receptores por los agonistas o antagonistas se ha podido realizar su clasificación. Estos agentes pueden diferir del mensaje natural, tanto en afinidad como en actividad intrínseca, el grado de asociación entre la hormona y su receptor específico se describe o mide en términos de "afinidad", abreviada como  $K_p$ . Mientras que la habilidad de una hormona, cuando se une a su receptor, para producir una respuesta biológica es llamada "actividad intrínseca".

Todas las células en el cuerpo están expuestas a diversas concentraciones de cada hormona, el receptor reconoce a la hormona bioactiva de entre una gran cantidad de otras sustancias, a las cuales esta expuesta la célula, y se une a esta. Las hormonas pueden estar presentes en una concentración de  $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  M, mientras que el total de otras proteínas y péptidos es cerca de  $10^{-3}$  M. Por lo que la hormona reconocida por el receptor representa una molécula en un millón y en ocasiones una en un billón.

El receptor puede existir en dos estados interconvertibles, un estado basal y un estado activado (4-5), los cuales están en equilibrio entre sí y se presentan debido a un cambio conformacional en el receptor, cuando éste se une a la hormona, de tal forma que el receptor pasa a un estado activado.

La unión de la hormona al receptor es necesaria pero no suficiente, la interacción hormona-receptor inicia una cadena de eventos bioquímicos que culmina con la estimulación de un sistema efector, que se encarga de producir o modificar la concentración de una sustancia capaz de alterar el funcionamiento celular, a la que se denomina segundo mensajero. Una vez que se genera, éste es reconocido por aceptores intracelulares (que generalmente son proteínas cinasas), que conducen a cambios en el funcionamiento celular.

A los procesos que ocurren desde la interacción hormona-receptor, hasta la generación del segundo mensajero se le llama **transducción**, y los que ocurren desde la generación del segundo mensajero hasta el efecto final, se denomina **propagación de la señal**.

Se conocen tres clases de receptores membranales, cada uno de los cuales transducen sus señales extracelulares por diferentes caminos:

1) **Receptores asociados a canales**, en este caso el receptor puede solamente estar asociado a un canal o funcionar el mismo como tal. Estos canales iónicos se abren o se cierran brevemente en respuesta a la unión de un mensajero químico, que en este caso generalmente es un neurotransmisor.

2) **Receptores con actividad de cinasas**, los cuales fosforilan directamente proteínas celulares específicas sobre residuos de tirosina. Entre estos podemos mencionar a los receptores de insulina, del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

3) **Receptores asociados a proteínas G**, éstos indirectamente activan o inactivan enzimas que se encuentran unidas a membrana plasmática o canales iónicos, mediante la unión de GTP por proteínas reguladoras, a las que se ha denominado **proteínas G** (6,7).

La transmisión del mensaje en este último mecanismo involucra tres componentes distintos presentes en la membrana:

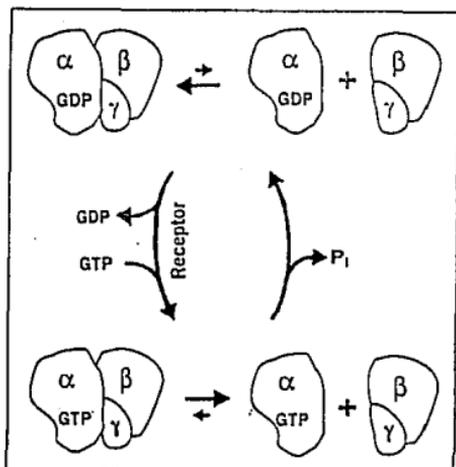
- Un receptor
- Una proteína reguladora "G"
- Una enzima o canal amplificadores.

La familia de receptores acoplados a proteínas G son glicoproteínas integrales de membrana que poseen una estructura con siete dominios transmembranales que se unen por medio de tres asas intracelulares y tres asas extracelulares.

El extremo amino terminal se encuentra localizado en el espacio extracelular y el carboxilo en el intracelular. Esta familia de receptores para hormonas, neurotransmisores y autacoides que se acopla a las llamadas proteínas G esta integrada por los receptores adrenérgicos, colinérgicos muscarínicos, la rodopsina, los receptores para serotonina, histamina, adenosina, angiotensina y vasopresina entre otros.

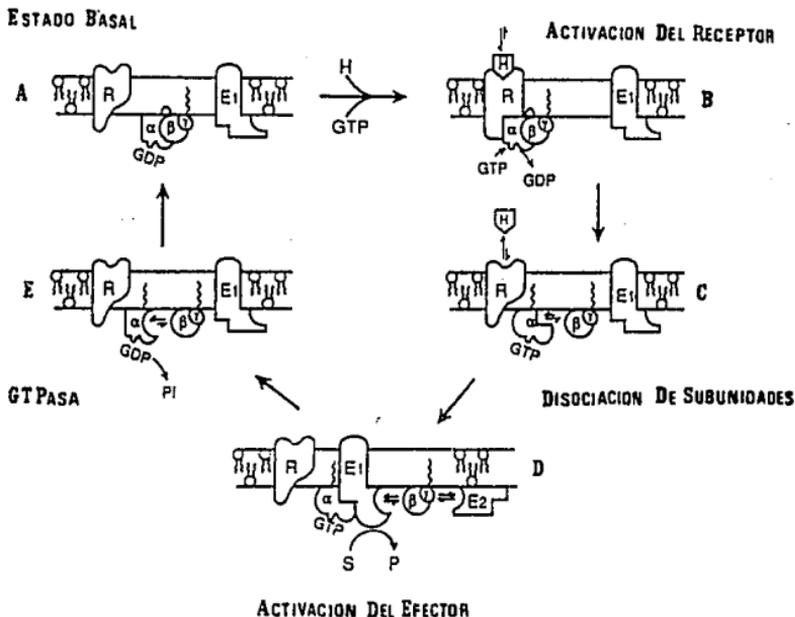
Las proteínas G que participan en la transducción de señales unen nucleótidos de guanina con alta especificidad y poseen una actividad intrínseca de GTPasa (6,7), con lo que modulan sus interacciones con otras proteínas. Presentan además una  $K_d$  para GTP y otra para GDP, y una constante de velocidad particular para la hidrólisis del GTP, lo que les da propiedades cinéticas diferentes [Fig 1].

Estas proteínas son heterotrimeros formados por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (8) cada una codificada por un gen diferente. La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio de unión de GTP-GDP y se halla unida al complejo  $\beta\gamma$  de manera no covalente, de esta manera funcionan modulando la afinidad del agonista por su receptor, acoplado esta interacción con los sistemas efectores [fig 2]. En el estado basal las proteínas G existen como heterotrimeros con GDP unido a la subunidad  $\alpha$ , el receptor para la hormona se encuentra libre y el efector no es regulado, después de la unión de la hormona y la activación del receptor éste último interactúa con el heterotrímero para promover un cambio conformacional y la disociación de GDP del sitio de unión de nucleótidos de guanina. La unión de GTP a  $G\alpha$  induce un cambio conformacional con dos consecuencias: 1) la proteína G se disocia del complejo hormona-receptor, reduciendo la afinidad de la hormona por su receptor, el cual regresa a su estado libre para otra nueva activación y 2) el GTP unido reduce la afinidad de  $G\alpha$  por  $G\beta\gamma$  y ocurre la disociación de subunidades quedando libre  $G\alpha$ -GTP para realizar su papel como regulador de efectores.



**Fig 1. MODELO PARA LA ACTIVACION DE PROTEINAS G.**

El estado funcional de una proteína G esta determinado por su nucleótido unido. Con GDP, la proteína G es inactiva y la asociación de sus subunidades se favorece. Cuando se une GTP, la proteína G es activada y la afinidad entre sus subunidades  $\alpha$ - y  $\beta\gamma$ - se reduce marcadamente. Los receptores estimulan a las proteínas G catalizando el recambio de GTP por GDP. Tomado de la referencia 9.



**Fig 2. SEÑALES TRANSMEMBRANALES MEDIADAS POR PROTEINAS G.**

(A) Estado basal; (B) Activación del receptor; (C) Unión de GTP a G $\alpha$ ; (D) Regulación de efectores; (E) Actividad intrínseca de GTPasa. Receptor (R); Efector (E<sub>1</sub>); Hormona (H); Efectores distintos (E<sub>2</sub>). Tomado de la referencia 10.

En algunos sistemas G $\beta\gamma$  libre también interactúa directamente con los efectores y modula la actividad del complejo activo, o actúa independientemente en efectores distintos. La subunidad G $\alpha$  posee actividad intrínseca de GTPasa, con la cual determina el tiempo de vida de las especies activadas y la respuesta fisiológica asociada. La hidrólisis de GTP a GDP en el sitio de unión, causa disociación y desactivación del complejo activo de manera que G $\alpha$ -GDP presenta alta afinidad por G $\beta\gamma$ , la reasociación subsecuente de G $\alpha$ -GDP con G $\beta\gamma$  regresa al sistema a su estado basal (10).

Por otra parte, las proteínas G son sustrato de algunas toxinas bacterianas que tienen actividad de ADP-ribosil-transferasa, como la toxina pertussis, producida por Bordetella pertussis y la toxina del cólera, producida por Vibrio cholerae. Estas toxinas modifican covalentemente a las proteínas G, utilizando NAD para hacer la transferencia de una molécula de ADP-ribosa.

A la fecha se ha descubierto que existen múltiples variedades de estas proteínas G, hay por lo menos dos formas de G $s$  (denominada G $s$  porque esta involucrada en la estimulación de la adenilato ciclasa), tres formas de G $i$  (llamada así porque inhibe a la adenilato ciclasa), G $o$ , G $q$  (se le ha llamado también G $p$  o G $x$ ), G $11$ , etc. (6,7). No se conoce la función de todas ellas, pero se sabe que un receptor puede interactuar con más de una proteína G y que esta a su vez puede modificar la actividad de más de un efector membranal.

Los sistemas de transducción de señales mas importantes acoplados a proteínas G son: el sistema de la Adenilato Ciclasa y el de Fosfoinosítidos-Calcio.

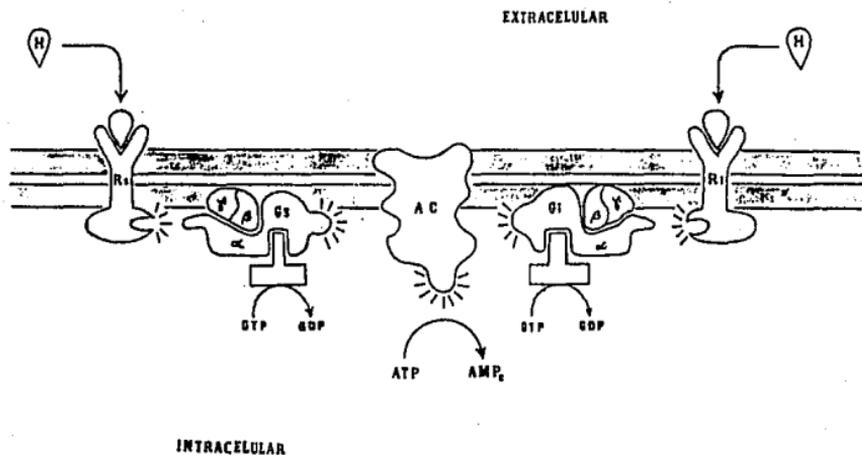
## SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA

En 1950 Earl Sutherland propuso el papel del AMPc como mediador de la acción de diversas hormonas (11a, 11b), actualmente es sin duda el segundo mensajero más conocido.

Este sistema de transducción se halla integrado por cinco elementos fundamentales: receptores estimulantes (Rs), receptores inhibidores (Ri), proteínas G acopladas de manera estimuladora (Gs), proteínas G acopladas de manera inhibitoria (Gi) y la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa [Fig 3].

Existen receptores acoplados en forma estimuladora, entre los que se incluyen los que responden a glucagon o vasopresina, y otros que se hallan acoplados en forma inhibitoria, como los receptores para somatostatina y acetilcolina, sin embargo existen ciertas hormonas como la epinefrina que son capaces de interactuar en forma indistinta con ambas clases de receptores y de inducir por tanto ambas acciones a través de receptores diferentes. Así la epinefrina ejerce su efecto estimulador elevando los niveles de AMPc a través de los receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , y  $\beta_3$ -adrenérgicos (12) y ejerce su efecto inhibitorio disminuyendo los niveles del mismo metabolito a través de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Hay evidencia de que los receptores  $\beta$  son capaces también de activar al transportador de  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  (13).

La estimulación de la adenilato ciclasa es iniciada por la unión de una hormona o agonista a un receptor estimulante. La unión de estos mensajeros primarios a sus receptores les provoca un cambio conformacional, lo que les permite interactuar con la proteína Gs, esta interacción provoca a su vez el recambio de nucleótidos y la disociación de las subunidades que conforman la proteína Gs (como se menciona anteriormente). La subunidad  $\alpha_s$ -GTP disociada se une a la adenilato ciclasa y la activa. Una vez que la subunidad  $\alpha_s$ -GTP es convertida a  $\alpha_s$ -GDP se disocia de la subunidad



**Fig 3. SISTEMA DE LA ADENILATO CICLASA.**

Receptor acoplado en forma estimuladora (R<sub>s</sub>);  
 Receptor acoplado en forma inhibitoria (R<sub>i</sub>);  
 Proteína G fijadora de nucleótidos de guanina  
 acoplada de manera estimuladora (G<sub>s</sub>) y de  
 manera inhibitoria (G<sub>i</sub>) con sus subunidades  
 α, β y γ; Adenilato Ciclasa (AC); Hormona (H).

catalítica y se reasocia con  $\beta\gamma$ . Al parecer la proteína  $G_i$  actúa de una manera muy similar, sólo que el complejo  $\alpha$ -GTP inhibe a la adenilato ciclasa al interactuar con esta (14). También se ha propuesto que la liberación del complejo  $\beta\gamma$  por la activación hormonal de  $G_i$ , puede asociarse con  $\alpha_s$  y de esta manera prevenir su activación (15).

Estas proteínas  $G_s$  y  $G_i$ , como se mencionó anteriormente, sirven a su vez de sustrato a toxinas bacterianas. La toxina del cólera es capaz de ADP-ribosilar a la subunidad  $\alpha$  de  $G_s$  en un residuo de arginina, bloqueando su actividad de GTPasa y dejándola entonces en forma permanentemente activa para estimular la producción de AMPc en las células (16,17). A su vez la toxina pertussis ADP-ribosila a la subunidad  $\alpha$  de  $G_i$  en un residuo de cisteína, bloqueando la actividad inhibitoria que ejerce sobre la adenilato ciclasa (18).

La adenilato ciclasa al ser activada hidroliza el trifosfato de adenosina (ATP) para formar una molécula de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc), que actúa como segundo mensajero, y pirofosfato. Una vez formado el segundo mensajero (AMPc), este es reconocido por la proteína cinasa A (PKA), enzima encargada de la propagación y amplificación de las señales acopladas a este sistema (19). La PKA, en ausencia de AMPc es un tetrámero asimétrico inactivo constituido por dos subunidades regulatorias y dos catalíticas; la unión del AMPc a las subunidades reguladoras altera su afinidad por las subunidades catalíticas, provocando su disociación en un dímero de subunidades reguladoras-AMPc y dos subunidades catalíticas en forma de monómeros (20). La subunidad catalítica promueve la fosforilación covalente en residuos de serina y treonina de proteínas específicas encargadas de producir la respuesta final (19).

El aumento en los niveles de AMPc que se producen durante la acción hormonal, se contrarresta por la acción de una enzima que se encarga de hidrolizar el AMPc en AMP lineal, denominada fosfodiesterasa, con lo cual la célula queda en condiciones de reaccionar ante una nueva señal (19,21).

## SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO

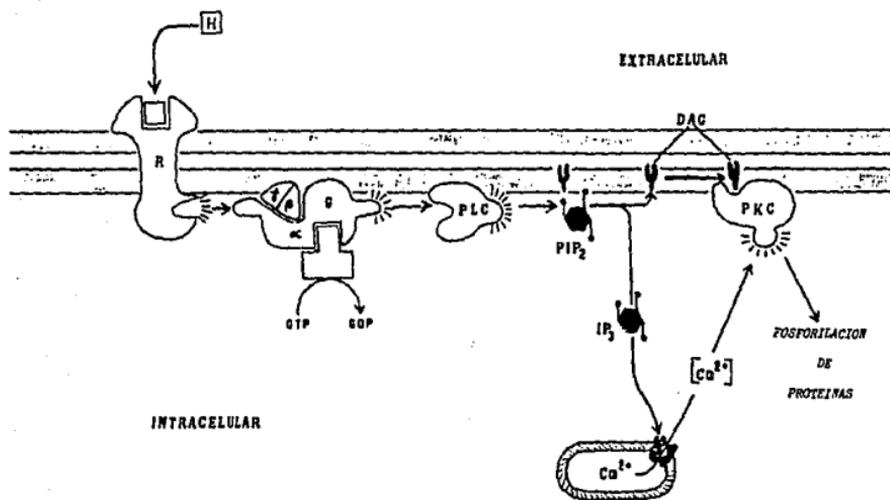
El sistema de fosfoinosítidos-calcio esta constituido por tres componentes: 1) receptores, 2) proteína reguladora "G", denominada Gp, y 3) una fosfodiesterasa, la fosfolipasa C (PLC) [Fig 4].

Algunos de los receptores acoplados estimulatoriamente a este sistema son los correspondientes a las siguientes hormonas: vasopresina, histamina, angiotensina II, serotonina, epinefrina (a través de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos), y algunos factores de crecimiento. Estas hormonas activan a su receptor, al unirse a él, y éste es capaz de inducir la hidrólisis de fosfolípidos y el aumento de calcio intracelular, como un mecanismo para transducir señales extracelulares hacia la célula.

La enzima responsable de catalizar la hidrólisis de fosfoinosítidos en este proceso es la fosfolipasa C (PLC). Fain y colaboradores (22), demostraron que se requería GTP, Gpp(NH)p o GTPyS para su activación, con lo que se demostró que dicha activación se lleva a cabo a través de una proteína G, fijadora de nucleótidos de guanina, denominada proteína Gp; obteniéndose como productos de la hidrólisis del fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>): el mio-inositol 1,4,5-trisfosfato (IP<sub>3</sub>) y el 1,2-diacilglicerol (DAG), los cuales funcionan como segundos mensajeros.

Se han identificado por lo menos dos tipos de proteínas G que se acoplan a la fosfolipasa C, una que presenta sensibilidad y otra insensible a la ADP-ribosilación por la toxina pertussis, estas han sido denominadas GPi y GPs respectivamente (25).

En cuanto a la fosfolipasa C, también se han identificado por lo menos cinco diferentes isoenzimas, a las cuales se les a asignado la siguiente nomenclatura: PLC- $\alpha$  (62-68 KDa), PLC-B (100-150 KDa), PLC- $\gamma$  1 y 2 (145 KDa), PLC- $\delta$  (85-88 KDa) y la PLC- $\epsilon$  (85 KDa), que difieren una de otra con respecto a su peso molecular,



**Fig 4. MODELO PARA EL SISTEMA DE FOSFOINOSITIDOS-CALCIO.**

Receptor (R); Proteina fijadora de nucleótidos de guanina (G) con sus subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ; Fosfolipasa C (PLC); Fosfatidilinositol bisfosfato (PIP<sub>2</sub>); Inositol trisfosfato (IP<sub>3</sub>); Diacilglicerol (DAG); Proteina cinasa C (PKC); Hormona (H).

carga, requerimiento de cationes divalentes, especificidad de sustrato y la forma de sus productos liberados (algunas fosfatos cíclicos y otras no cíclicos) (26).

El  $IP_3$ , debido a su naturaleza hidrosoluble tiene la propiedad de difundirse al citoplasma celular y así interactuar con receptores que se localizan en la superficie del retículo endoplásmico, produciendo la apertura de un canal que promueve la liberación de calcio (19), el sitio de liberación de este catión parece encontrarse en posibles regiones especializadas de éste organelo y se les a llamado calciosomas (27).

El calcio liberado tiene una importante función, ya que activa directamente a un gran número de enzimas o a través de proteínas cinasas dependientes de calcio o de un complejo calcio-calmodulina. La concentración de calcio libre citosólica funciona como un importante mecanismo por el cual hormonas y factores de crecimiento regulan muchos procesos celulares tales como la secreción, el metabolismo y la liberación de neurotransmisores, el crecimiento celular y la diferenciación.

Al aumentar transitoriamente la concentración intracelular de calcio, este es capturado por el mismo retículo endoplásmico y las mitocondrias y además es expulsado de la célula a través de una ATPasa de calcio, con lo que la concentración de este catión disminuye rapidamente en el interior de la célula.

Por otra parte el diacilglicerol, por su naturaleza hidrofóbica permanece en la membrana, donde activa directamente a una proteína cinasa, denominada proteína cinasa C (PKC) (28).

A la fecha se han identificado por lo menos ocho isoformas de la PKC, con estructuras estrechamente relacionadas entre sí, las cuales se han denominado: PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta_1$ , PKC- $\beta_{11}$ , PKC- $\gamma$ , PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\xi$  y PKC- $\eta$  (29), estas isoformas poseen diferencias en su modo de activación, propiedades cinéticas y especificidad de sustrato (30,31). Se han subdividido en dos grupos (29): las calcio dependientes ( $\alpha, \beta$  y  $\gamma$ ) y las calcio independientes ( $\delta, \epsilon, \xi$  y  $\eta$ )

(32,33). Todas ellas poseen dos regiones: una hidrofóbica o regulatoria, en la cual se encuentran los sitios de unión a calcio, diacilglicerol y al fosfolípido, y otra hidrofílica en la que se encuentra el sitio catalítico.

Para su activación, la proteína cinasa C requiere de  $Ca^{2+}$  y de fosfatidilserina (34). Se sabe que el diacilglicerol aumenta la afinidad de la enzima por el calcio. Sin embargo, la PKC también puede ser activada por una serie de agentes que promueven la formación de tumores, que se han denominado, ésteres de forbol (35), uno de los más activos y que más se ha empleado en el estudio de la PKC es el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), que posee una estructura en la que se incluye la del diacilglicerol, y debido a su naturaleza lipídica, el PMA tiene la propiedad de atravesar la membrana plasmática y activar directamente a la PKC.

Una vez que la PKC ha sido activada, fosforila una serie de proteínas, que contribuyen con la respuesta final. Entre los sustratos de esta proteína se incluyen: proteínas de membrana, como el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (36-38), la insulina (39), el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (40), así como proteínas que intervienen en el metabolismo celular, como es la glucógeno fosforilasa cinasa (41).

Entre las acciones de la PKC, algunos investigadores han demostrado que es capaz de ejercer un control de regulación de la señal de su propio sistema de transducción. Esto se ha estudiado ampliamente en el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, demostrando que el PMA bloquea las acciones de este receptor (40-47), lo que constituye un ejemplo de retroalimentación negativa del sistema de fosfoinosítidos-calcio.

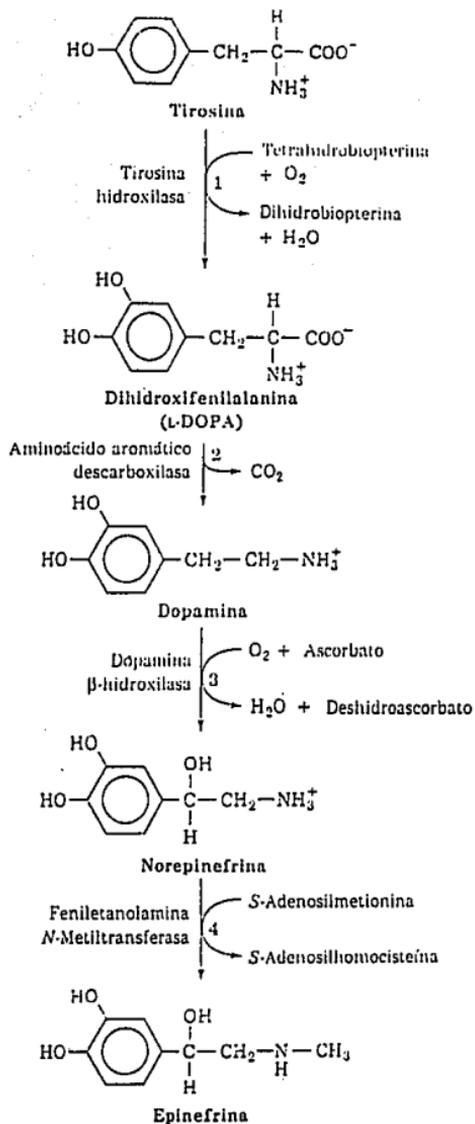
## RECEPTORES ADRENERGICOS

Los receptores acoplados a proteínas G son importantes reguladores fisiológicos, ya que son el blanco de una multitud de hormonas, neurotransmisores así como de factores autócrinos y parácrinos. Los receptores adrenérgicos representan a una gran familia de receptores mebranales que interactúan con proteínas G durante los procesos de transducción de señales transmembranales, que se encargan de mediar los efectos de dos agonistas fisiológicos: la epinefrina y la norepinefrina, además de otros compuestos sintéticos relacionados estructuralmente con la epinefrina que son simpaticomiméticos.

Tanto la epinefrina como la norepinefrina son derivados del mismo aminoácido (la tirosina) [fig 5]. La adrenalina o epinefrina es una hormona secretada por la médula suprarrenal que ejerce sus efectos sobre el sistema nervioso simpático. Es secretada cuando el organismo se encuentra ante una situación de estrés o emergencia y desencadena una serie de respuestas que preparan al organismo para actuar.

Entre lo efectos más importantes que produce se encuentran: incremento en la velocidad de la glucogenólisis en el hígado y en el músculo y la lipólisis en el tejido adiposo, la activación de algunos tipos de músculo liso como el de vasos sanguíneos que irrigan la piel, las mucosas y algunas glándulas como las salivales, incrementa la frecuencia cardíaca, estimula la frecuencia de la respiración y la actividad psicomotora. Así como también la liberación de algunos neurotransmisores como la acetilcolina y la misma epinefrina, entre otros.

La gran diversidad de efectos producidos por una sola hormona llevo a sugerir la existencia de diversos tipos de receptores adrenérgicos. La clasificación  $\alpha$  y  $\beta$  de estos receptores fue propuesta por Ahlquist (48), él definió de acuerdo al orden de



**Fig 5. Biosíntesis de Catecolaminas.**

potencia que presentaban seis aminas simpaticomiméticas en la vasodilatación y la estimulación miocárdica, como  $\alpha$  a los receptores asociados predominantemente a las funciones estimuladoras, excepto en el intestino, y como  $\beta$  a los receptores asociados con la mayoría de las funciones inhibitorias, excepto en el corazón. En 1958 esta hipótesis fue confirmada por Powell y Slater (49) y por Moran y Perkins (50), al demostrar que la acción estimuladora de las catecolaminas en los receptores  $\beta$  podía ser antagonizada con dicloroisoproterenol. Estudios posteriores demostraron que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos eran heterogéneos y que se podían diferenciar en dos subtipos los  $\beta_1$  y los  $\beta_2$ . La subclasificación de receptores  $\beta$  en los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_2$  fue originalmente demostrada por Furchgott (51) y Lands y cools. (52). Posteriormente se propuso la subclasificación de los receptores  $\alpha$  distinguidos por su localización anatómica y su especificidad farmacológica, los receptores  $\alpha$  presinápticos denominados  $\alpha_2$ , fueron sugeridos para inhibir la liberación de norepinefrina de las terminales nerviosas (53), mientras que los receptores postsinápticos denominados  $\alpha_1$  se les atribuyo que mediaban la contracción del músculo liso y otros efectos postsinápticos.

Posteriormente encontraron receptores con características farmacológicas del subtipo  $\alpha_2$ , localizados postsinápticamente (54,55) y en plaquetas (56,57) las cuales carecen de terminales nerviosas. Por esta razón el concepto inicial para diferenciar estos dos tipos de receptores ha tenido que cambiar, basándose en una clasificación farmacológica y funcional de tal forma que ahora los términos pre y postsinápticos se refieren solamente a la localización particular del receptor  $\alpha$ -adrenérgico con respecto a la sinapsis. La designación  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$  se basa exclusivamente en la farmacología de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en cuestión, independientemente de su función o localización anatómica (58-60).

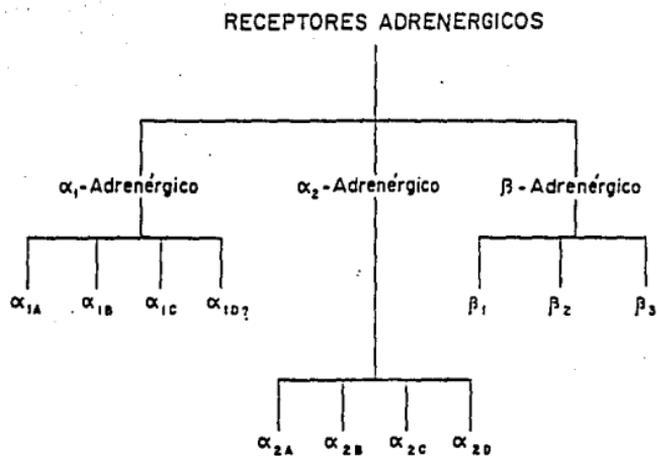
Los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  son isoreceptores, pues ambos se acoplan estimulatoriamente a la adenilato ciclasa. Por otra parte Robison

en 1971 (61), propone que los receptores  $\alpha$  están acoplados de manera inhibitoria a la adenilato ciclasa.

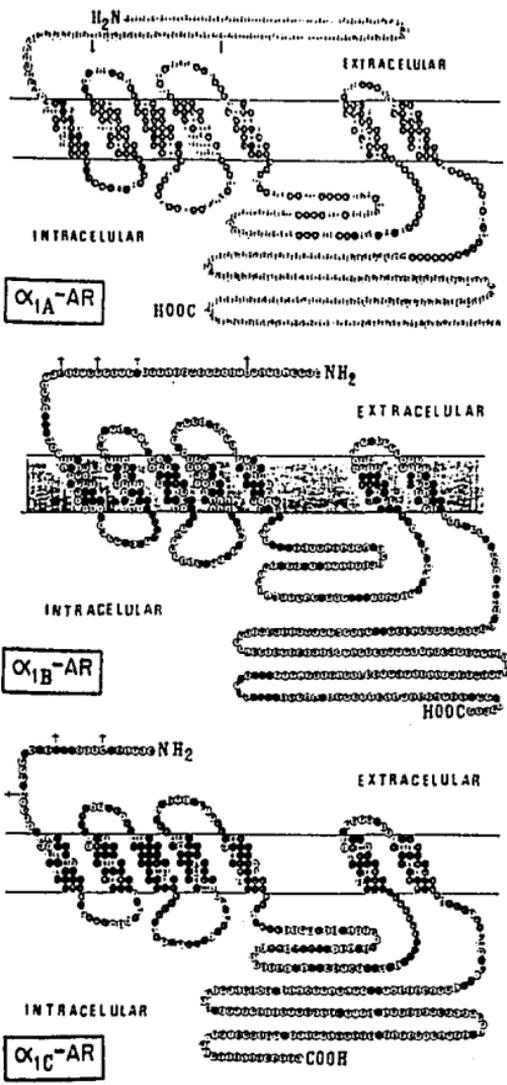
Posteriormente Jones y Michell (62) sugieren que la activación de los receptores  $\alpha$  involucra un recambio de fosfatidil inositol y un incremento de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular.

En 1980, Fain y García-Sáinz (63) establecen que la división de los receptores  $\alpha$  en  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  no sólo implica diferencias farmacológicas, sino también funcionales. Estos autores proponen que el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico involucra un recambio de fosfatidil inositol y un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular; mientras que el receptor  $\alpha_2$  inhibe a la adenilato ciclasa por un mecanismo independiente de  $\text{Ca}^{++}$ . Posteriormente se hicieron comparaciones de los mapas peptídicos de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ -adrenérgicos y se observó que presentan poca similitud estructural (64).

El desarrollo de muchos compuestos que permiten diferenciar a estos subtipos y la utilización de estudios de asociación de ligandos radioactivos ("binding") han mostrado diversidad en los dos diferentes tipos de receptores adrenérgicos, establecidos también con ayuda del criterio bioquímico, el cual se basa en el mecanismo de transducción de cada tipo de receptor y finalmente confirmados mediante técnicas de biología molecular [fig 6]. De esta forma a la fecha se han descrito al menos tres subtipos de receptores  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ) (65-68), cuatro subtipos de receptores  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  y  $\alpha_{2D}$ ) (69) y en cuanto a los receptores  $\alpha_1$ , se sugirió primeramente por criterio farmacológico la existencia de dos subtipos,  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$  (70-72). El receptor  $\alpha_{1B}$  ha sido clonado y expresado (73), mientras que la clonación del subtipo  $\alpha_{1A}$  no se ha podido llevar a cabo, sin embargo han sido clonados otros dos miembros de esta familia, los subtipos  $\alpha_{1C}$  y  $\alpha_{1D}$ -adrenoreceptores (73-75). El subtipo  $\alpha_{1C}$  presenta un perfil farmacológico diferente a los subtipos  $\alpha_{1A}$  y  $\alpha_{1B}$ , indicando que se trata de un nuevo subtipo (74, 76) [fig 7]. El otro receptor fue clonado y expresado (75),



**Fig 6. CLASIFICACION DE LOS RECEPTORES ADRENERGICOS.**



**Fig 7. MODELO ESTRUCTURAL DE LOS RECEPTORES  $\alpha_1$ -ADRENERGICOS.**  
 Receptores  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ - y  $\alpha_{1C}$ -adrenérgicos, tomados de las referencias 69, 75 y 68 respectivamente.

dicho receptor presentaba algunas similitudes con el subtipo  $\alpha_{1A}$ , sin embargo análisis de Northern blot de tejidos de rata mostraban que este receptor no tenía la distribución característica del receptor  $\alpha_{1A}$ , estudios más detallados mostraron algunas claras diferencias entre éste subtipo y el "clásico subtipo  $\alpha_{1A}$ " por lo que se tomo como un receptor "atípico" y fue clasificado como  $\alpha_{1D}$ -adrenérgico. Debido a que son esencialmente idénticos, excepto por dos codones, y a que se observaron discretas diferencias farmacológicas entre ellos (77), se ha propuesto la designación  $\alpha_{1A/D}$  para este último subtipo, hasta que el receptor  $\alpha_{1A}$  clásico sea clonado y revisada su clasificación.

Las técnicas de asociación de ligandos ("binding") que emplean agonistas y antagonistas adrenérgicos marcados radioactivamente con muy alta actividad específica, permiten definir la cantidad de receptores presentes en membranas o en células completas y determinar su afinidad para los diferentes agentes adrenérgicos (78).

El método más frecuentemente empleado para el estudio directo de la interacción hormona-receptor sobre la superficie celular, se realiza mediante la interacción in vitro del receptor, hormona marcada y hormona no marcada y es similar en principio a otros ensayos competitivos. La hormona esta marcada con radioactividad a muy alta actividad específica bajo condiciones suaves, reteniendo así la bioactividad. Para minimizar las reacciones laterales, especialmente la degradación de la hormona y del receptor, las preparaciones de receptor son preferiblemente células intactas o membranas plasmáticas purificadas y la reacción usualmente se lleva a cabo a bajas temperaturas (<37°C) por tiempos largos. Cuando se alcanza un estado de equilibrio, la preparación de receptores es separada del medio por sedimentación o filtración, y la radioactividad asociada con las membranas o células se cuenta y esta se designa como "pegado total". La proporción de radioactividad en la membrana o pellet celular que esta pegado a

receptores específicos se designa como "pegado específico"; este representa el componente saturable del pegado y varía con la concentración de la hormona. El sobrante de radioactividad que esta asociado con la membrana o pellet celular, se designa como "pegado no específico" y representa un componente no saturable; operacionalmente este es una porción del pegado total que siempre esta presente cuando hay un exceso de hormona no marcada. De esta forma en cada concentración de hormona, el pegado específico es igual al pegado total menos el pegado no específico.

Con los datos anteriores, si la hormona marcada y la hormona no marcada reaccionan de igual forma en el sistema, se evita su degradación y si los reactivos están en un equilibrio termodinámico, los datos del pegado pueden ser analizados, calculando la concentración total de receptores y la afinidad de la hormona por el receptor. El sistema puede ser usado para medir y caracterizar el receptor o la hormona.

El apoyo farmacológico a la clasificación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se basó en los estudios realizados utilizando agonistas y antagonistas [fig 8 y 9], de esta forma se han reportado algunos agentes como:

Prazosina, el prototipo de una familia de agentes que contienen un núcleo de piperazinil quinazolina, es un muy potente y selectivo antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico. Su afinidad para el receptor  $\alpha_1$  es alrededor de 1000 veces más grande que para receptores  $\alpha_2$ . Tiene afinidad muy similar para los subtipos  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , y  $\alpha_{1C}$ . La [ $^3$ H]prazosina ha sido considerada un ligando altamente selectivo para caracterizar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, mediante técnicas de asociación de ligando radioactivo, las curvas de saturación obtenidas con [ $^3$ H]prazosina son generalmente monofásicas.

Yohimbina y fentolamina, son más potentes inhibidores de la respuesta  $\alpha_2$ -adrenérgica (79-81), sin embargo estos últimos

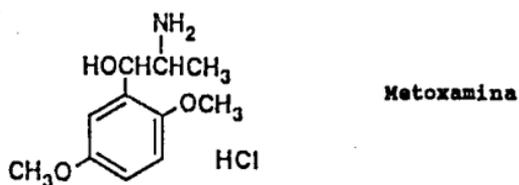
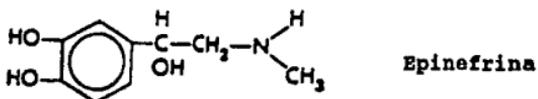
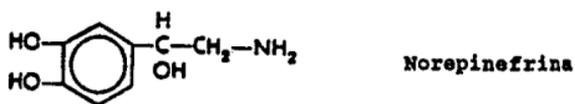
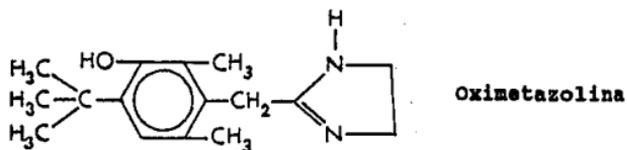
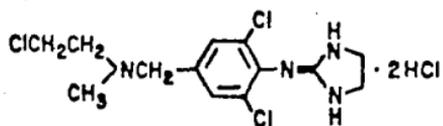
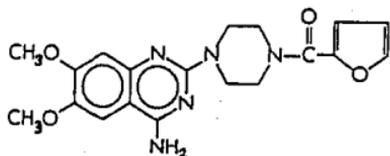


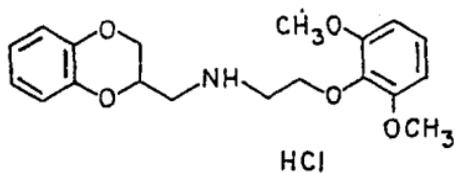
Fig 8. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNOS AGONISTAS  $\alpha_1$ -ADRENERGICOS.



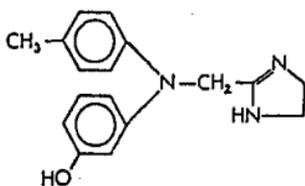
**Cloroetilclonidina (CEC)**



**Prazosina**

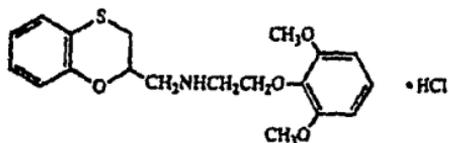


**WB-4101**

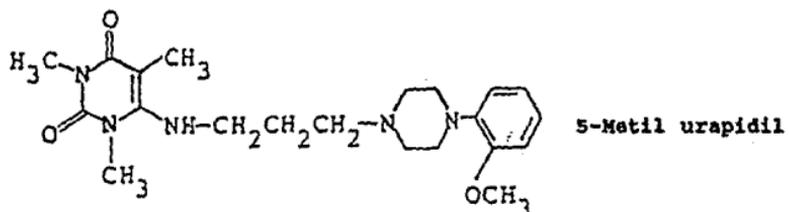


**Fentolamina**

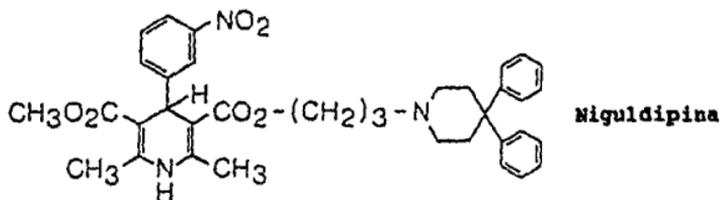
**Fig 9. ESTRUCTURA QUIMICA DE ALGUNOS ANTAGONISTAS  $\alpha_1$ -ADRENERGICOS.**



**Benoxatim**



**5-Metil urapidil**



**Niguldipina**

**Continuación Fig 9.**

antagonistas son capaces de bloquear ambos tipos de receptores  $\alpha$ , cuando se usan en altas concentraciones.

En 1986 se reportó que el [ $^3\text{H}$ ]WB 4101 (70) se une a dos sitios con diferente afinidad, uno en rango picomolar y otro en rango nanomolar. El WB 4101 presenta mayor afinidad por un subtipo que se ha denominado  $\alpha_{1A}$  por su mayor afinidad a la fentolamina, que por el otro subtipo llamado  $\alpha_{1B}$ .

Posteriormente se desarrolló otro compuesto que permite distinguir el otro subtipo de receptor menos sensible al WB 4101 denominado cloroetilclonidina (CEC), un agente alquilante análogo de clonidina, el cual aparentemente presenta igual afinidad para los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos inactivándolos de manera irreversible, excepto al subtipo  $\alpha_{1A}$  (71,72,82).

Más tarde se describió otro compuesto aún más selectivo que el WB 4101 para la identificación farmacológica del subtipo  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico, al cual se le denominó 5-metil urapidil (5-MU) y se ha utilizado también en estudios de asociación.

Reportes subsecuentes no únicamente confirmaron estos resultados, además adicionaron a la lista de compuestos que discriminan entre receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos a los siguientes: oximetazolina, (+)niguldipina, metoxamina y benoxatán. De los cuales, 5-metil urapidil (83) y (+)niguldipina (84,85) han sido reportados como antagonistas altamente selectivos para el subtipo  $\alpha_{1A}$ ; metoxamina, como un agonista selectivo con menor afinidad para  $\alpha_{1B}$  que para los subtipos  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1C}$  (69,75), de manera similar oximetazolina, un agonista  $\alpha_1$ , presenta mayor afinidad por  $\alpha_{1C}$  que por los demás subtipos, sin embargo entre estos presenta mayor afinidad por el subtipo  $\alpha_{1B}$  que por  $\alpha_{1A}$  (69,75).

De esta forma, mediante criterios farmacológicos, bioquímicos y de biología molecular, se tienen las características básicas de los subtipos hasta ahora definidos.

## OBJETIVOS

Los estudios desarrollados acerca de los receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos han proporcionado evidencias del tipo farmacológicas, bioquímicas y de biología molecular que indican: 1) la existencia de subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y 2) la expresión de varios subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en el hígado de diversas especies (86), por lo cual en el presente trabajo planteamos:

-Caracterizar farmacológicamente con diversos agonistas y antagonistas el subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico presente en hígado de ratón.

-Confirmar el subtipo de receptor presente en hígado de ratón, comparando estos resultados con los obtenidos en la caracterización del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico en hígado de rata, siendo este el prototipo del subtipo de receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### MATERIALES

Las drogas y agentes fueron obtenidos de las siguientes fuentes: (-)epinefrina, (-)norepinefrina, oximetazolina y prazosina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Benoxatian, 5-metil urapidil, cloroetilclonidina y WB-4101 se obtuvieron de Research Biochemicals Inc. Fentolamina de Ciba-Geigy, metoxamina de Burroughs Wellcome y (+)niguldipina de Byk Gulden, fueron generosamente donados por las compañías farmacéuticas indicadas. La [<sup>3</sup>H]prazosina (80 Ci/mmol) fue adquirida de New England Nuclear. 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 ratones hembras o machos de la cepa CD1 con un peso aproximado de 25 a 30 g y ratas Wistar hembras con un peso de 200 a 220 g. La dieta de estos animales fue de autoconsumo, que consistía de proteína cruda no menos de 23.0%, grasa cruda no menos de 4.5%, fibra cruda no más de 6.0%, ceniza no más de 8.0% y minerales agregados no más de 2.1% (Laboratory rodent diet 5001. PMI feeds, Inc.).

### MÉTODOS

#### OBTENCIÓN DE MEMBRANAS DE HEPATOCITOS

Las membranas de hígado de las diferentes especies, se obtuvieron por el método de Neville (87).

Para lo cual se sacrificaron los animales, se extrajo el hígado y se fragmentó. Los fragmentos de hígado se homogeneizaron a 4°C en un homogeneizador Dounce con 25 ml de una solución de NaHCO<sub>3</sub> 1 mM por cada 10 g de hígado. El homogeneizado se filtró y el filtrado se centrifugo a 8,000 rpm (10,400 x g) durante 15 minutos a 4°C, el precipitado resultante se resuspendió en una solución de sacarosa al 69%, en una relación volumen-volumen, se homogeneizó nuevamente y se ajustó a 44% de sacarosa con un refractómetro, el homogeneizado se distribuyó en tubos de centrifuga de 30 ml y se adicionaron a cada tubo 10 ml de sacarosa al 42.3% formando un gradiente de densidad. Estos gradientes se centrifugaron a 25,000 rpm (113,000 x g) durante 150 minutos a 4°C.

Al final de la centrifugación se extrajo la fracción de membranas (que se observó claramente flotando en la superficie) se resuspendió en una solución amortiguadora fría de Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7.5, se homogeneizaron y se lavaron dos veces por centrifugación a 15,000 rpm (27,000 x g) durante 15 minutos a 4°C cada vez. Las pastillas resultantes se resuspendieron y homogeneizaron en la misma solución amortiguadora. Esta suspensión de membranas se guardó en alícuotas en nitrógeno líquido.

La cantidad de proteína en las membranas se cuantificó por el método de Lowry et al (88) utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

#### **PRETRATAMIENTO CON CLOROETICLONIDINA (CEC)**

Se descongelaron alícuotas de la preparación de membranas y posteriormente se resuspendieron en 10 ml de solución amortiguadora Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7.5, se incubaron en presencia o ausencia de CEC 10 µM en baño de agua con agitación durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo por dilución con 20 ml del mismo amortiguador y centrifugación a 15,000 rpm (27,750 x g) durante 15 minutos a 4°C.

Las pastillas resultantes se lavaron dos veces resuspendiendo en 20 ml del amortiguador y centrifugando nuevamente. Las pastillas finales se resuspendieron en el mismo volumen de la alícuota original. Estas membranas se utilizaron para estudios de saturación con ligando radioactivo.

#### ESTUDIOS DE ASOCIACION (BINDING) DE LIGANDO RADIOACTIVO.

Las preparaciones de membranas se descongelaron (sobre hielo) y homogeneizaron antes de cada experimento. Para los estudios de "binding" se utilizaron aproximadamente 100 µg de membranas, que se incubaron con el ligando radioactivo [<sup>3</sup>H]prazosina en ausencia o presencia de los diferentes agonistas o antagonistas que se indican en cada caso, en un volumen total de 0.25 ml de la solución amortiguadora Tris 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, a pH 7.5, durante 30 minutos en un baño de agua con agitación a 25°C. Al final de la incubación se adicionaron 10 ml de la solución amortiguadora fría, a la suspensión de membranas y se filtró inmediatamente al vacío a través de filtros de fibra de vidrio GF/C (Whatman) previamente saturados en la solución amortiguadora. Los filtros se lavaron tres veces con 10 ml del mismo amortiguador cada vez.

La cuantificación del ligando radioactivo unido a los receptores se determinó en un contador de centelleo líquido, para ello los filtros una vez lavados se colocaron en viales añadiendo 4 ml de líquido de centelleo a cada uno.

#### EXPERIMENTOS DE SATURACION

El análisis de saturación con el ligando radioactivo, se realizó incubando las membranas con concentraciones crecientes de 0.5 a 15 nM de [<sup>3</sup>H]prazosina.

La cantidad de ligando unido específicamente se determinó por la diferencia entre la cantidad de [<sup>3</sup>H]prazosina unida en presencia y ausencia de fentolamina 10 μM (antagonista α<sub>1</sub>-adrenérgico selectivo).

#### EXPERIMENTOS DE COMPETENCIA

Los experimentos de competencia se realizaron incubando las membranas con concentraciones de 0.8 a 1.0 nM de [<sup>3</sup>H]prazosina (para lograr un 80-85% de ocupación de los receptores) en ausencia o en presencia de cada uno de los siguientes agonistas: epinefrina, norepinefrina, metoxamina y oximetazolina, o los antagonistas: prazosina, fentolamina, 5-metil urapidil, WB-4101, benoxatian y (+)niguldipina en diversas concentraciones. La cantidad de ligando unido específicamente se evaluó de la misma forma como se mencionó anteriormente.

#### ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados de los estudios de asociación de [<sup>3</sup>H]prazosina (saturación y competencia) se realizó mediante los programas EBDA y LIGAND (89) (Biosft-Elsevier).

Los valores de  $B_{max}$  (número máximo de receptores) y de  $K_D$  (constante de afinidad) para la unión específica de [<sup>3</sup>H]prazosina se obtuvieron por el análisis de Scatchard (Rosenthal) de los resultados obtenidos en los experimentos de saturación.

La capacidad para inhibir la unión específica de [<sup>3</sup>H]prazosina de los distintos agonistas y antagonistas, se determinó calculando la constante de inhibición ( $K_i$ ) de acuerdo a la ecuación de Cheng y Prusoff (90):  $K_i = IC_{50} [K_D / (L + K_D)]$ , donde  $IC_{50}$  es la concentración del ligando competitivo necesaria para causar el 50% de inhibición

de la unión del ligando radioactivo.  $L$  es la concentración del ligando radioactivo y  $K_0$  es la constante de disociación del radioligando.

#### OBTENCION DE LOS HEPATOCITOS

Los hepatocitos se aislaron por el método de digestión con colagenasa de Berry y Friend (91). El cual consiste en canular la vena porta hepática y perfundir el hígado con amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato (KRB), sin calcio a 37°C, bajo una atmósfera de carbógeno (95%  $O_2$  / 5%  $CO_2$ ) a pH 7.4, una vez perfundido, el hígado se digirió perfundiendo con colagenasa en KRB con calcio 1.2 mM. Después se separaron las células y la suspensión de estas se lavó tres veces con KRB con calcio.

#### EXTRACCION DE RNA

Los hepatocitos se adicionaron en tubos eppendorf (50 mg/tubo), se resuspendieron en 500  $\mu$ l de la solución TRI (TRI reagent) (92) y se agitaron vigorosamente en un vortex, después se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo isoamilico (49:1) y se agitaron 15 seg. Los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm (7250 x g) durante 10 minutos en frío, posteriormente se tomaron 250  $\mu$ l de la fase acuosa y se colocaron en tubos nuevos adicionando a cada tubo 250  $\mu$ l de isopropanol frío al 100%, después de lo cual se dejó precipitar el RNA a -20°C durante 30 minutos. Las muestras se centrifugaron nuevamente y se decantó el sobrenadante. Las pastillas conteniendo el RNA se resuspendieron con 1 ml de etanol frío al 75% y se centrifugaron de nueva cuenta, el sobrenadante se decantó y se dejaron secar las pastillas, durante 20 min a temperatura ambiente, para después solubilizar el RNA, añadiendo a cada tubo 50  $\mu$ l de  $H_2O$  tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.2%.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280 nm, en base a la relación 1 DO a 260 nm = 40 µg/ml de RNA. La relación entre las lecturas a 260/280 nm se utilizó para determinar impurezas por proteína, considerando pura una muestra con índice de 2.0 para RNA. Finalmente el RNA se sometió a electroforesis en gel de agarosa (Standar Low de BIO-RAD) al 1.5%, a 1 mA/cm<sup>2</sup>. Para observar el estado del RNA, que no debe estar degradado, al final de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### ANALISIS DE NORTHERN BLOT

Para realizar el análisis de northern blot (93), se sometieron 20 µg de RNA, por carril, a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% con formaldehído al 17%. Como amortiguador de corrida se utilizó MENP 1x (4.18 g de MOPS, 0.68 g de CH<sub>3</sub>COONa, 0.37 g de EDTA y 20 ml de fosfato de Na y K 1 M pH 6.9) y una solución de pozos (1 ml de MENP 10x, 7.2 ml de H<sub>2</sub>O y 1.8 ml de formaldehído al 37%) con la cual se llenaron los pozos de gel. Las muestras de RNA se trataron adicionándoles 1/3 parte de una mezcla de muestras (400 µl de formamida desionizada, 120 µl de formaldehído al 37% y 90 µl de MENP 10x) y se calentaron a 65°C durante 5 minutos colocándolas inmediatamente en hielo durante 5 minutos, después se añadieron 1/4 parte de solución de azul de bromofenol (50% de glicerol, 1 mM de EDTA, 10 mM de fosfato de Na y K pH 6.9 y 0.05% de azul de bromofenol). Las muestras se cargaron en los pozos del gel, cubriendo este con parafilm para evitar la evaporación del formaldehído, la electroforesis se corrió a 1 mA/cm<sup>2</sup> en el cuarto frío, recirculando el amortiguador de corrida con una bomba peristáltica.

Al final de la electroforesis el RNA se transfirió a filtros de nylon (Amersham) utilizando el método de Southern (94). El gel

sin tratar ni teñir, se colocó en una charola limpia, con puentes de papel filtro Whatman para que halla contacto con el amortiguador de transferencia SSPE 20x (175.3 g de NaCl, 27.6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 7.4 g de EDTA, pH 7.4), y sobre el gel se colocó el filtro de nylon del tamaño exacto, poniendo sobre el nylon papel filtro 3 MM (Whatman) y acomodando toallas de papel del tamaño del gel, aplicando un peso de ~0.5 Kg sobre un vidrio presionando las toallas. La transferencia se dejó durante 2 días. Después de la transferencia el nylon se dejó secar entre 2 filtros Whatman y luego se horneó a 80°C durante 2.5 hrs.

#### CONDICIONES DE HIBRIDACION

El filtro de nylon se colocó en una solución de prehibridación (35% formamida desionizada, 10% dextrán sulfato, SSPE 5x, Denhardt 5x, 1% SDS y 5 mg/ml de DNA inespecifico) en una bolsa de polietileno sellada y se dejó a 55°C durante 4 hrs. Una vez prehibridado el filtro, a la solución de prehibridación se le agregó la sonda de hibridación (los insertos se marcaron por "Nick translation" a una actividad específica de  $1-2 \times 10^8$  dpm/ $\mu\text{g}$ ), sellando nuevamente la bolsa y se dejó hibridando toda la noche a 55°C (en todos los experimentos se usó 1  $\mu\text{g}$  del DNA radioactivo para la hibridación).

Posteriormente los filtros se lavaron dos veces con SSC 0.2x (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7.4) y 0.2% de SDS durante 15 minutos a 55°C cada vez, dos veces con SSC 0.1x y SDS 0.1% por 15 minutos a 55°C y finalmente 1 vez con SSC 0.1x durante 15 minutos a temperatura ambiente.

## AUTORRADIOGRAFIA

Se utilizaron placas para autorradiografía (Kodak X-Omat) que se expusieron en presencia del filtro de 7 a 10 días. Esto se realizó colocando el cassette para placas radiográficas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las placas se revelaron con los reactivos indicados por el fabricante.

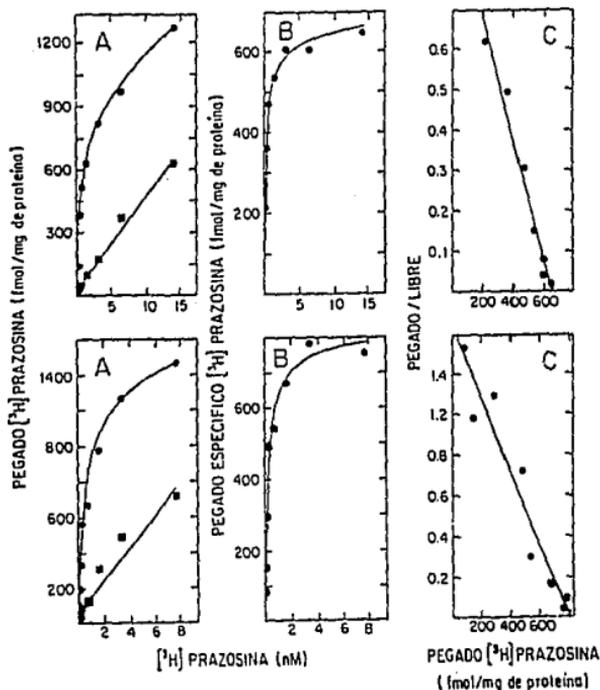
## BONDAS DE HIBRIDACION

Las sondas de hibridación fueron las siguientes: la sonda del receptor  $\alpha_{1A}$ -adrenérgico fue del fragmento BamHI de 0.85 kb (75); la sonda del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico fue del fragmento EcoRI-BamHI del cDNA del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico de hamster (73) (fragmento subclonado en el sitio EcoRI del pSP65); y la sonda del receptor  $\alpha_{1C}$ -adrenérgico fue del fragmento BglII de 0.94 kb (74).

## RESULTADOS

Se detectó la existencia de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en hepatocitos de ratón, mediante experimentos de saturación utilizando [ $^3$ H]prazosina, un antagonista selectivo para receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, los cuales se cuantificaron con el mismo radioligando.

En los datos obtenidos de los experimentos de saturación el pegado de [ $^3$ H]prazosina a los receptores presentes en membranas de hígado de ratón y rata, se mostró como una función de la concentración del radioligando, dicho pegado fue con alta afinidad, específico y saturable a concentraciones crecientes de [ $^3$ H]prazosina, en ambas especies. El pegado no específico que se determinó en presencia de fentolamina 10  $\mu$ M, se observó que incrementa en forma lineal [fig 1A], el pegado específico que se obtuvo por la diferencia entre el pegado de [ $^3$ H]prazosina en ausencia (pegado total) y presencia (pegado inespecífico) de fentolamina 10  $\mu$ M, se saturó aproximadamente a una concentración de 5 nM en membranas de hígado de ratón y de 4 nM en el caso de rata. La mitad del pegado máximo ocurrió a una concentración aproximada de [ $^3$ H]prazosina de 0.3 a 0.5 nM, en membranas de hígado de ratón y rata [fig 1B]. Las curvas de saturación que se obtuvieron en ambas especies son monofásicas, lo que describió la existencia de una población homogénea de sitios de unión, esto se corroboró con el análisis de Rosenthal rutinariamente llamado análisis de Scatchard, que es la transformación lineal de la relación entre el ligando unido al receptor y la concentración de ligando libre obtenida en las curvas de saturación, con lo cual es relativamente fácil calcular los valores de  $K_D$  y  $B_{max}$  gráficamente o por regresión lineal graficando la relación pegado/libre vs pegado.



**FIGURA 1.**

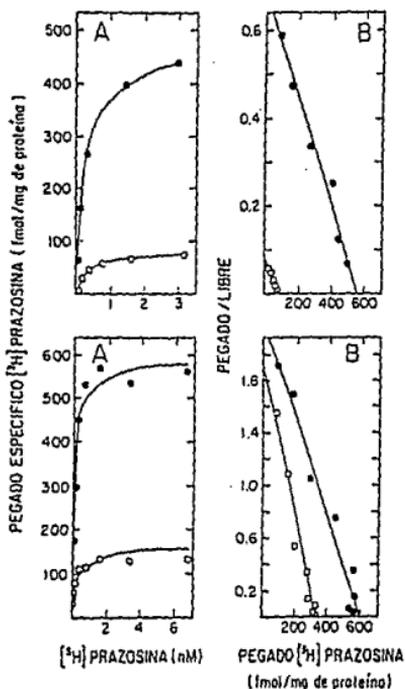
**CURVAS DE SATURACION DE [<sup>3</sup>H] PRAZOSINA.** En membranas de hígado de ratón (Paneles superiores) y membranas de hígado de rata (Paneles inferiores). **A**, las membranas fueron incubadas con diferentes concentraciones de [<sup>3</sup>H] prazosina y en ausencia (pegado total, círculos llenos) o presencia (pegado no específico, cuadros llenos) de 10  $\mu$ M de fentolamina; **B**, pegado específico de [<sup>3</sup>H] prazosina a receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos; **C**, análisis de Scatchard de las curvas de saturación de [<sup>3</sup>H] prazosina. Las figuras son representativas de 3-6 experimentos usando diferentes preparaciones de membranas en cada caso.

El análisis de Scatchard [Fig 1C] que se obtuvo describió un comportamiento lineal, lo que nos indicó que la población de sitios de unión reconocidos por [<sup>3</sup>H]prazosina en ambas especies, presentan una afinidad homogénea para este ligando, con una constante de afinidad ( $K_D$ ) para [<sup>3</sup>H]prazosina de  $\approx 0.3$  nM. El promedio  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos similares con diferentes preparaciones de membranas, fue de  $0.29 \pm 0.03$  nM para ratón y  $0.22 \pm 0.09$  nM para rata.

El cálculo del número máximo de sitios de unión ( $B_{max}$ ) fue de  $554 \pm 39$  fmol/mg de proteína de membranas de hígado de ratón y de  $868 \pm 30$  fmol/mg de proteína de membranas de hígado de rata, como promedio de cuatro experimentos similares con diferentes preparaciones de membranas en cada caso.

Para determinar el subtipo de receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico presente en membranas de hígado de ratón, se realizaron experimentos de saturación utilizando membranas preincubadas con cloroetilclonidina (CEC)  $10 \mu\text{M}$  durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  (como se describe en métodos), un agente particularmente usado para diferenciar subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos (72). En la figura 2A se puede observar que el pegado específico de [<sup>3</sup>H]prazosina decreció notablemente en membranas preincubadas con CEC  $10 \mu\text{M}$  como corresponde a los subtipos del receptor  $\alpha_{1B}$  o  $\alpha_{1C}$ -adrenérgico. En las membranas de hígado de ambas especies preincubadas en presencia o ausencia de CEC  $10 \mu\text{M}$ , el pegado específico de [<sup>3</sup>H]prazosina fue con alta afinidad y saturable con concentraciones crecientes del ligando.

El análisis de Scatchard [fig 2B] describió también una población homogénea de sitios de unión, con una constante de disociación de  $0.37 \pm 0.02$  nM y  $0.41 \pm 0.02$  nM para membranas de hígado de ratón preincubadas en ausencia y presencia de CEC  $10 \mu\text{M}$  respectivamente, el número de sitios de unión ( $B_{max}$ ) fue de  $464 \pm 56$  fmol/mg y  $109 \pm 8$  fmol/mg de proteína de membranas de hígado de ratón preincubadas en ausencia y presencia de CEC  $10 \mu\text{M}$  respectivamente.



**FIGURA 2.**  
**EFEECTO DE LA PREINCUBACION CON CLOROETILCLONIDINA SOBRE EL PEGADO DE [3H] PRAZOSINA.** En membranas de hígado de ratón (Paneles superiores) y membranas de hígado de rata (Paneles inferiores). Las membranas fueron preincubadas en ausencia (círculos llenos) o presencia (círculos vacíos) de 10 μM de cloroetilclonidina durante 10 minutos a 37°C. A, pegado específico de [3H] prazosina; B, análisis de Scatchard de las curvas de saturación de [3H] prazosina. Las figuras son representativas de 3-6 experimentos usando diferentes preparaciones de membranas en cada caso.

En el caso de ratas se observó una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $0.29 \pm 0.18$  nM y  $0.17 \pm 0.08$  nM en membranas preincubadas en ausencia y presencia de CEC  $10 \mu\text{M}$  respectivamente, el número de sitios de unión ( $B_{\text{max}}$ ) fue de  $635 \pm 93$  fmol/mg y  $234 \pm 31$  fmol/mg de proteína de membranas preincubadas en ausencia y presencia de CEC  $10 \mu\text{M}$  respectivamente.

Estos resultados indicaron que la preincubación por sí misma causó un decremento en el número de sitios de unión del 15-30% en las membranas de ambas especies, sin embargo fue evidente que la incubación con CEC redujo marcadamente el número de receptores, observando una disminución en la  $B_{\text{max}}$  aproximadamente del 65-75% cuando se compararon los valores obtenidos en membranas preincubadas con y sin CEC, sin cambiar significativamente la afinidad de los sitios, lo cual nos indicó que se trataba de subtipos  $\alpha_{1B}$  o  $\alpha_{1C}$ -adrenoreceptores. Los valores de  $K_D$  y  $B_{\text{max}}$  se resumen en la tabla I.

Se realizaron otros experimentos, donde las membranas de ambas especies fueron incubadas con concentraciones mayores de CEC ( $100 \mu\text{M}$ ) durante 30 minutos, observando bajo estas condiciones que el pegado específico de [ $^3\text{H}$ ]prazosina esencialmente desapareció.

El perfil farmacológico de estos sitios de unión se estudió mediante experimentos de competencia, con base al orden de potencia que presentaban algunos agentes para inhibir el pegado de [ $^3\text{H}$ ]prazosina (agonistas: epinefrina, norepinefrina, oximetazolina y metoxamina; antagonistas: prazosina, fentolamina, benoxatian, 5-metil urapidil, WB-4101 y (-)niguldipina).

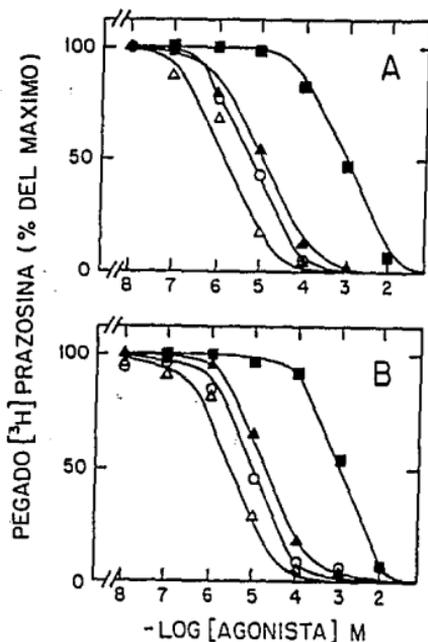
Se observó que en las membranas de hígado de ratón el orden de potencia para agonistas fue: oximetazolina ( $K_i \approx 0.76 \mu\text{M}$ ) > epinefrina ( $K_i \approx 1.85 \mu\text{M}$ )  $\geq$  norepinefrina ( $K_i \approx 3.29 \mu\text{M}$ ) >> metoxamina ( $K_i \approx 253 \mu\text{M}$ ) [Fig 3A] y para antagonistas el orden de potencia fue: prazosina (\*) > WB 4101 ( $K_i \approx 4.0$  nM) > benoxatian ( $K_i \approx 16$  nM)  $\geq$  fentolamina ( $K_i \approx 28$  nM) > 5-metil urapidil ( $K_i \approx 109$  nM) [Fig 4A].

**TABLA I**

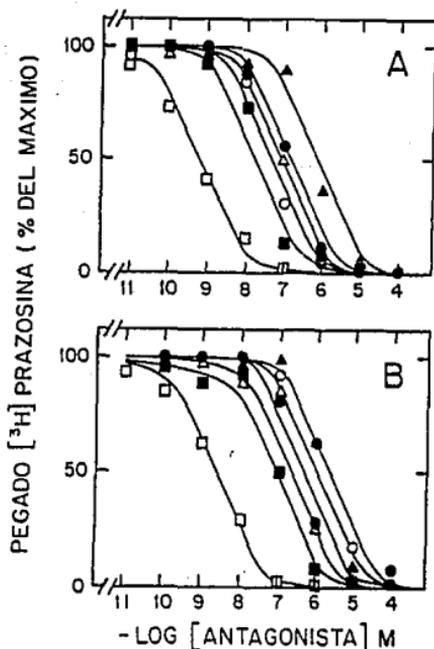
**PARAMETROS DE LAS GRAFICAS DE SATURACION DE [3H] PRAZOSINA EN MEMBRANAS DE HIGADO DE RATONES Y RATAS.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	<b>B<sub>max</sub> (fmol/mg)</b>
<b>Ratón</b>		
Sin incubar	0.29 ± 0.03	554 ± 39
Preincubadas solas	0.37 ± 0.02	464 ± 56
Preincubadas con CEC	0.41 ± 0.02	109 ± 8
<b>Rata</b>		
Sin incubar	0.22 ± 0.09	868 ± 30
Preincubadas solas	0.29 ± 0.18	635 ± 93
Preincubadas con CEC	0.17 ± 0.08	234 ± 31

Los resultados son valores promedio ± el error estándar de 3-6 experimentos utilizando diferentes preparaciones de membranas en cada caso. CEC, cloroetilclonidina.



**FIGURA 3.**  
**INHIBICION DEL PEGADO ESPECIFICO DE [<sup>3</sup>H] PRAZOSINA POR AGONISTAS α<sub>1</sub>-ADRENERGICOS.** Panel A, membranas de hígado de ratón; Panel B, membranas de hígado de rata. Las membranas fueron incubadas en presencia de 0.8 a 1.0 nM de [<sup>3</sup>H] prazosina y de diferentes concentraciones de los siguientes agonistas: oximetazolina, triángulos vacíos; epinefrina, círculos vacíos; norepinefrina, triángulos llenos y metoxamina, cuadros llenos. Las figuras son representativas de 3-6 experimentos usando diferentes preparaciones de membranas.



**FIGURA 4.**  
**INHIBICION DEL PEGADO ESPECIFICO DE [<sup>3</sup>H] PRAZOSINA POR**  
**ANTAGONISTAS  $\alpha_1$ -ADRENERGICOS.** Panel A, membranas de  
 higado de ratón; Panel B, membranas de higado de rata.  
 Las membranas fueron incubadas en presencia de 0.8 a 1.0  
 nM de [<sup>3</sup>H] prazosina y de diferentes concentraciones de  
 los siguientes antagonistas: prazosina, cuadros vacíos;  
 WB 4101, cuadros llenos; benoxatian, círculos llenos;  
 fentolamina, triángulos vacíos; (+)niguldipina, círculos  
 vacíos y 5-metil urapidil, triángulos llenos. Las figuras  
 son representativas de 3-6 experimentos utilizando  
 diferentes preparaciones de membranas.

En membranas de hígado de rata el orden de potencia para agonistas fue: oximetazolina ( $K_i \approx 1.23 \mu\text{M}$ ) > epinefrina ( $K_i \approx 2.18 \mu\text{M}$ )  $\geq$  norepinefrina ( $K_i \approx 4.37 \mu\text{M}$ )  $\gg$  metoxamina ( $K_i \approx 261 \mu\text{M}$ ) [Fig 3B] y para antagonistas el orden de potencia que se observó fue: prazosina ( $K_i \approx 0.76 \text{ nM}$ ) > WB 4101 ( $K_i \approx 18 \text{ nM}$ ) > fentolamina ( $K_i \approx 60 \text{ nM}$ ) = benoxatian ( $K_i \approx 73 \text{ nM}$ ) > 5-metil urapidil ( $K_i \approx 262 \text{ nM}$ ) [Fig 4B].

Como pudo observarse los valores de  $K_i$  para agonistas y antagonistas fueron muy similares, presentando un mismo orden de potencia, que correspondió al subtipo  $\alpha_{1B}$  y las pendientes de las curvas de competencia fueron muy cercanas a 1 (0.90-1.0 para agonistas y de 0.75-1.0 para antagonistas) en ambas especies, lo cual nos indicaba que estos sitios marcados con [ $^3\text{H}$ ]prazosina eran esencialmente homogéneos. Estos resultados se representan en las figuras 3 y 4 y en la tabla II.

En el caso de (+)niguldipina se observó una mayor afinidad en las membranas de hígado de ratón ( $K_i \approx 10 \text{ nM}$ ) comparada con las de rata ( $K_i \approx 171 \text{ nM}$ ), esta variación en la afinidad para (+)niguldipina ha sido previamente observada en receptores del mismo subtipo y se ha atribuido a su elevada hidrofobicidad (95). Ya que es posible que las membranas de diferentes especies contengan distintas cantidades o tipos de lípidos; lo que puede marcar la diferencia en el grado de partición de las membranas lo cual puede modificar la afinidad aparente del receptor. Sin embargo la alta afinidad encontrada en membranas de ratón para dicho antagonista, quedó dentro del rango observado para el subtipo del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

En la curva de competencia con prazosina como ligando no marcado usando membranas de hígado de ratón, la pendiente obtenida fue consistentemente menor de 1 (0.6-0.85), lo que indicó la presencia de sitios de unión heterogéneos para este antagonista. El análisis de "LIGAND" (89) de estos datos mostró que la curva de competencia con prazosina se ajustó mejor a dos sitios con diferente afinidad, describiendo una población de sitios de muy

**TABLA II**

**AFINIDADES DE LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS PARA RECEPTORES  $\alpha_1$  ADRENERGICOS EN MEMBRANAS DE HIGADO DE RATONES Y RATAS.**

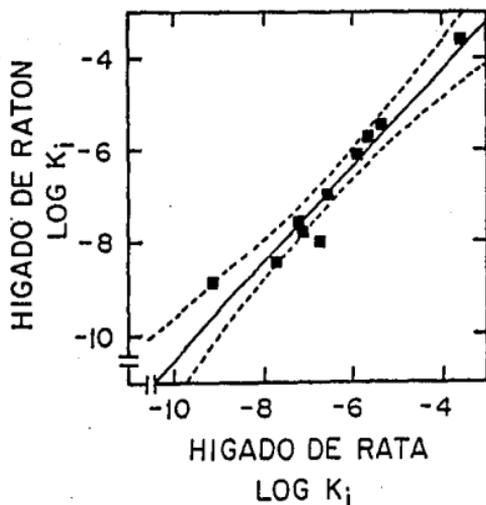
AGENTE	RATON $K_i$	RATA $K_i$
<b>Agonistas (<math>\mu</math>M)</b>		
Oximetazolina	0.76 $\pm$ 0.08 (4)	1.23 $\pm$ 0.21 (4)
Epinefrina	1.85 $\pm$ 0.04 (3)	2.18 $\pm$ 0.11 (4)
Norepinefrina	3.29 $\pm$ 0.15 (3)	4.37 $\pm$ 0.92 (4)
Metoxamina	253.00 $\pm$ 36.00 (4)	261.00 $\pm$ 25.00 (4)
<b>Antagonistas (nM)</b>		
Prazosina	*	0.76 $\pm$ 0.09 (3)
WB-4101	4 $\pm$ 1 (9)	18.00 $\pm$ 3.00 (3)
Fentolamina	28 $\pm$ 4 (5)	60.00 $\pm$ 10.00 (3)
Benoxatian	16 $\pm$ 3 (6)	73.00 $\pm$ 20.00 (3)
5-Metilurapidil	109 $\pm$ 24 (6)	262.00 $\pm$ 62.00 (3)
(+) Niguldipina	10 $\pm$ 2 (6)	171.00 $\pm$ 9.00 (3)

Los valores de  $K_i$  se determinaron como se describe en materiales y métodos. Los resultados son el promedio  $\pm$  error estándar con el número de experimentos indicado en paréntesis, utilizando diferentes preparaciones de membranas.

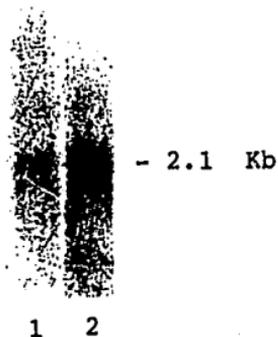
alta afinidad con una  $K_d = 8.6 \pm 2.9$  pM y una población de sitios de baja afinidad con una  $K_d = 1.3 \pm 0.6$  nM como promedio de 8 experimentos  $\pm$  error estándar usando preparaciones diferentes de membranas. La afinidad del último sitio esta dentro del rango de valores observados para la interacción de prazosina con receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, pero el sitio de alta afinidad esta varios ordenes de magnitud abajo. Por esta razón se intentó desplazar estos sitios de alta afinidad con otros antagonistas adrenérgicos sin obtener resultados, lo cual nos sugirió que este es un sitio no adrenérgico, debido a que no respondió a estos agentes. Sin embargo el sitio de baja afinidad que sí corresponde a un subtipo  $\alpha_1$ -adrenérgico se tomó para realizar el análisis comparativo con el presente en rata.

Para confirmar la identidad de los receptores presentes en membranas de hígado de ratones y ratas, se realizó un análisis de correlación de los valores de  $K_d$ , basándonos en reportes recientes en los que Bylund et al (96) muestra que un camino más sistemático para analizar la identidad de los receptores es mediante la correlación de los valores de  $K_d$  de un gran número de drogas selectivas. De esta forma se observa identidad cuando el coeficiente de correlación es alto ( $\sim 1$ ) y la pendiente de la línea de correlación (slope) es cercano a la unidad. Con este método graficando el logaritmo de los valores de  $K_d$  obtenidos en los experimentos de competencia en membranas de hígado de ratón contra los obtenidos en membranas de hígado de rata (prototipo del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico), se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.97 y una pendiente de 1.04 [Fig 5], lo que nos confirmó que este receptor pertenecía al subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

Finalmente para comprobar la presencia de receptores  $\alpha_{1B}$ -adrenérgicos en estas especies se realizó un análisis de Northern blot. Para ello se utilizó RNA total de hepatocitos de ratón y de rata para hibridarlo con sondas del DNA complementario de los subtipos  $\alpha_{1B}$  (73),  $\alpha_{1C}$  (74), y  $\alpha_{1A/D}$  (75), en las autorradiografías de los filtros se observó que el RNA de ambas especies hibridó con el cDNA correspondiente al subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico [fig 6].



**FIGURA 5.**  
**GRAFICA DE CORRELACION DE LOS VALORES DEL LOG  $K_i$ , DE LOS**  
**DIFERENTES AGONISTAS Y ANTAGONISTAS PARA LOS RECEPTORES**  
 **$\alpha_1$ -ADRENERGICOS EN MEMBRANAS DE HIGADO DE RATON Y RATA.**  
**Coefficiente de correlación = 0.97, pendiente = 1.04.**



**FIGURA 6.**  
**ANALISIS DE NORTHERN.** El RNA de hepatocitos de ratón (línea 1) y de rata (línea 2), muestran bandas de hibridación con la sonda correspondiente al cDNA del receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

La existencia de subtipos del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico estuvo inicialmente basada en criterios farmacológicos (70-72), sin embargo la aplicación de poderosas técnicas de biología molecular permitieron la clonación y expresión de diferentes subtipos de receptores que no se habían apreciado previamente, tales como el subtipo  $\alpha_{1c}$  (74) o el subtipo  $\alpha_{1b}$ -adrenérgicos (cuya relación con el subtipo  $\alpha_{1A}$  aún no es clara) (77).

El objetivo del presente estudio fue la caracterización del receptor adrenérgico presente en hepatocitos de ratón, usando la técnica de asociación de ligando radioactivo ("binding"), para lo cual se utilizó [ $^3$ H]prazosina que es considerada un ligando altamente selectivo para caracterizar receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos ya que su afinidad para los receptores  $\alpha_1$  es 1000 veces más grande que para receptores  $\alpha_2$ .

Los experimentos de saturación mostraron que el antagonista [ $^3$ H]prazosina, se unía a un número finito de sitios de alta afinidad presentes en membranas de hígado de ratón y de rata, indicando estos resultados una clase de sitios de unión con una capacidad de pegado de  $554 \pm 39$  fmol/mg de proteína y una constante de disociación de  $0.29 \pm 0.03$  nM en el caso de ratón y en rata una capacidad de pegado de  $868 \pm 30$  fmol/mg proteína y una constante de disociación de  $0.22 \pm 0.09$  nM.

Por otra parte en los resultados fue claro que estos receptores son sensibles a cloroetilclonidina (CEC) [fig 2], un antagonista que presenta igual afinidad por los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos inactivándolos irreversiblemente, excepto al subtipo  $\alpha_{1A}$  que lo inactiva de manera reversible (71,72,82). Los datos indicaban entonces que el subtipo presente en hepatocitos de ratón pertenecía al subtipo  $\alpha_{1b}$  o  $\alpha_{1c}$ , ya que en estos experimentos el 65-75% de los receptores fueron bloqueados por este agente [tabla I].

Al realizar la preincubación de las membranas con concentraciones mayores de CEC (100  $\mu$ M) y por tiempos más largos (30 min) se observó que estos sitios eran totalmente bloqueados en membranas de hígado de rata, sin embargo en membranas de hígado de ratón, bajo las mismas condiciones, se observó una mínima cantidad residual de receptores a los que [ $^3$ H]prazosina se unía. Esta cantidad residual de receptores al no ser bloqueados por CEC de manera irreversible, se pensó que podrían pertenecer al subtipo  $\alpha_{1A}$ , por lo que se estudiaron realizando experimentos de competencia utilizando dos antagonistas con alta afinidad para sitios  $\alpha_{1A}$ , 5-metil urapidil y benoxatian, obteniendo de las curvas de competencia una afinidad muy baja, lo cual no permitió identificar con certeza el subtipo. Sin embargo, una posibilidad importante es que sean receptores  $\alpha_{1B}$  pero que no estén "accesibles" a la cloroetilclonidina por la vesiculación de las membranas.

La existencia de alguno de estos subtipos se confirmó mediante estudios de competencia, en los que se valoró la potencia que presentaban diferentes agentes para bloquear el pegado específico de [ $^3$ H]prazosina.

Los resultados obtenidos mostraron claras diferencias en cuanto a la sensibilidad a varios agonistas y antagonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos, observando que estos receptores presentan una afinidad considerablemente menor por 5-metil urapidil ( $K_i \approx 109$  nM) que por prazosina ( $K_i \approx 1.3$  nM) lo cual representó información muy valiosa ya que estos valores están en el rango observado en otras células que expresan el subtipo  $\alpha_{1B}$ , donde el 5-metil urapidil presenta una afinidad muy baja para dicho subtipo, esto también se reportó en otros trabajos (83) donde usando membranas de hepatocitos observaron que 5-metil urapidil compite con baja afinidad por el sitio de unión de [ $^3$ H]prazosina.

Por otro lado se observó una relativa baja afinidad por WB 4101 ( $K_i \approx 4.0$  nM) en estos estudios de asociación lo cual está dentro de los valores observados para el subtipo  $\alpha_{1B}$  en otras

células (70,97), donde se ha obtenido una excelente correlación entre el porcentaje de receptores identificados por su sensibilidad a CEC y el porcentaje de receptores  $\alpha_{1B}$  identificados por una baja afinidad para WB 4101 (98), por lo que los antagonistas WB 4101 (70), CEC (71) y 5-metil urapidil (83) han sido particularmente usados para definir el perfil farmacológico de estos subtipos.

Existen características farmacológicas que reflejan la identificación de un sitio con mayor afinidad para fentolamina (el cual ha sido llamado  $\alpha_{1A}$ ) o uno con baja afinidad (llamado  $\alpha_{1B}$ ), con lo que se ha determinado que fentolamina tiene 23 veces más baja afinidad para el subtipo  $\alpha_{1B}$  que para el subtipo  $\alpha_{1A}$ , mientras que prazosina presenta igual afinidad por ambos subtipos (70), la relación de las potencias de afinidad de fentolamina contra los propuestos por prazosina proveen un buen índice para tal clasificación: prazosina es 3.5 veces más potente que fentolamina en sitios  $\alpha_{1A}$  definidos por binding pero 80 veces más potente que fentolamina en sitios  $\alpha_{1B}$ . De igual forma en otros trabajos reportaron como características esenciales de este esquema de clasificación para los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en corteza cerebral de rata que [ $^3H$ ]prazosina tiene similar o igual afinidad por los dos sitios de unión mientras que los antagonistas WB 4101 y fentolamina fueron aproximadamente de 40 a 20 veces más potentes en el sitio 1A que en el sitio 1B (70,98). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en hepatocitos de ratón ya que los valores de  $K_i$  obtenidos para prazosina y fentolamina fueron de 1.3 y 28 nM respectivamente.

Finalmente en cuanto a los antagonistas, los valores de  $K_i$  obtenidos para benoxatian y (+)niguldipina también presentaron baja afinidad para el receptor en hepatocitos de ratón siendo sus valores de -16 y -10 nM respectivamente, es importante mencionar que esto ha sido observado, (+)niguldipina, WB 4101, 5-metil urapidil y benoxatian tienen mayor afinidad por el subtipo  $\alpha_{1A}$  y muy baja afinidad por el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (70,83,84,95,99).

Con respecto a los agonistas utilizados, se estudiaron entre estos epinefrina y norepinefrina que son las catecolaminas naturales que interactúan con estos receptores y porque difieren en su afinidad y actividad sobre los diferentes subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos que también se observa con oximetazolina y metoxamina.

Metoxamina fue sugerido como un agonista selectivo  $\alpha_{1A}$  (100,101), posteriormente en un estudio comparativo de las acciones de estos agonistas (metoxamina y oximetazolina) en diferentes especies que expresan distintos subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos (97), reportaron que metoxamina presentaba una considerable baja afinidad por el subtipo  $\alpha_{1B}$  que por los subtipos  $\alpha_{1A}$  o  $\alpha_{1C}$  (69,75) y que oximetazolina tiene mayor afinidad por el subtipo  $\alpha_{1C}$  que por los otros subtipos, sin embargo entre estos presenta mayor afinidad por el subtipo  $\alpha_{1B}$  que por el subtipo  $\alpha_{1A}$  (69,75). En relación a nuestros datos, estos mostraron claras diferencias en los valores de  $K_i$  obtenidos para metoxamina y oximetazolina: 253 y 0.76  $\mu M$  respectivamente, observando que metoxamina esencialmente no tiene buena afinidad, lo cual concuerda con lo que ha sido observado en hepatocitos de rata que expresan el subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico (97,100).

De esta forma, nuestros datos indicaron que el orden de potencia para los distintos agonistas fue: oximetazolina > epinefrina  $\geq$  norepinefrina >> metoxamina y para antagonistas fue: prazosina > WB 4101  $\geq$  fentolamina = benoxatian > 5-metil urapidil en membranas de hígado de ratón, este mismo orden se presentó en rata donde se ha estudiado ampliamente y parece ser el prototipo del subtipo  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico, por lo cual se realizó el estudio comparativo entre estas dos especies, determinando así que los hepatocitos de ambas especies presentan el mismo subtipo de receptor por presentar la misma farmacología. Las pendientes obtenidas en las curvas de competencia de estos agentes adrenérgicos fueron cercanas a la unidad (0.9-1.0 para agonistas y

de 0.75-1.0 para antagonistas), lo cual sugirió una población de sitios con afinidad homogénea en ambas especies. Sin embargo, como se mencionó en la parte de resultados, la pendiente de la curva de competencia con prazosina fue distinta de 1 (0.6-0.85), el análisis de ésta se ajustó mejor a dos sitios con diferente afinidad, un sitio con baja afinidad ( $K_1 = 1.3 \pm 0.6$  nM) que corresponde a sitios  $\alpha_1$ -adrenérgicos y un sitio con muy alta afinidad ( $K_H = 8.6 \pm 2.9$  pM) para el cual no tenemos una clara explicación, ya que no tiene afinidad por todos los demás antagonistas adrenérgicos empleados, lo que nos sugirió que se trata de un sitio no adrenérgico que tiene muy alta afinidad por prazosina, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que otro subtipo  $\alpha_1$ -adrenérgico este presente en una pequeña cantidad del total de receptores adrenérgicos en estas membranas.

Comparando las afinidades de los diferentes agonistas y antagonistas empleados, en términos de  $\log K_i$ , se corroboró mediante un análisis de correlación la identidad de los subtipos  $\alpha_1$ -adrenérgicos presentes en membranas de hígado de ratón y rata en el que se obtuvo un buen coeficiente de correlación (0.97) y una pendiente muy cercana a la unidad (1.04), lo que nos confirmó que efectivamente se trata del mismo subtipo.

Lo anterior se comprobó finalmente con un análisis de Northern, utilizando RNA total de hepatocitos de ambas especies y los DNA complementarios de los receptores  $\alpha_{1B}$  (73),  $\alpha_{1C}$  (74) Y  $\alpha_{1A/D}$  (74) donde se observó que los RNA de las dos especies hibridizaron con el cDNA correspondiente al subtipo  $\alpha_{1B}$  [fig 6], con lo cual se comprobó que estas especies expresan el mismo subtipo:  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

Por último quisiera discutir acerca de la gran variabilidad que existe en los subtipos de receptores expresados en hepatocitos, la razón de tal variabilidad aún se desconoce, el significado funcional de esta rica diversidad de subtipos de receptores permanece a ser dilucidada. Presumiblemente esto permite un alto

grado de especificidad y control de procesos fisiológicos y bioquímicos en el organismo. Desde una perspectiva farmacológica esto puede permitir el descubrimiento de drogas selectivas con relativamente pocos efectos laterales, tampoco se conoce todavía con precisión la distribución de cada subtipo en todos los tejidos, se ha observado por ejemplo que en hígado, el subtipo de receptor y la densidad de este por célula varía según la especie (en hepatocitos de rata se expresa el subtipo  $\alpha_{1B}$ , mientras que en hepatocitos de cuyo  $\alpha_{1A}$  y en hepatocitos de conejo  $\alpha_{1C}$ ) (97).

Para subtipos de receptores que son funcionalmente significativos, ellos difieren de cada uno en algún camino en adición a su estructura primaria. Estas diferencias funcionales pueden estar incluidas en una o más de las siguientes: 1) diferencias en la afinidad por la hormona o neurotransmisor natural; 2) diferencias en afinidad para agonistas y/o antagonistas; 3) diferente localización anatómica; 4) diferente mecanismo de transducción de señales y 5) diferencias en la regulación de la densidad de receptores.

Por lo anterior es de interés la caracterización de los receptores expresados en diferentes especies, esperando que esto pueda proveer un conocimiento más profundo en cuanto al significado fisiológico y evolutivo de esta gran diversidad de subtipos de receptores.

## CONCLUSIONES

Los datos presentes confirmaron la existencia de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en membranas de hepatocitos de ratón, identificados mediante estudios de asociación de ligando radioactivo, utilizando [ $^3$ H]prazosina.

De los estudios de asociación se pudo obtener una saturación con el ligando radioactivo, denotando una  $K_D \approx 0.3$  nM y una  $B_{max} \approx 554$  fmol/mg de proteína de membranas de hígado de ratón.

El subtipo del receptor adrenérgico identificado en estas células fue predominantemente  $\alpha_{1B}$ , debido a su sensibilidad a cloroetilclonidina (CEC) y de acuerdo al perfil farmacológico que presentó, obteniendo el siguiente orden de potencia, para los agonistas: oximetazolina > epinefrina  $\geq$  norepinefrina >> metoxamina y para los antagonistas: prazosina > WB 4101  $\geq$  fentolamina = benoxatán > 5-metil urapidil.

Al realizar el estudio comparativo entre hepatocitos de ratón y hepatocitos de rata, los resultados mostraron claramente la misma sensibilidad a estos agentes, lo cual nos indicó que estos tejidos de ambas especies expresan el mismo subtipo: el receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico.

La identidad de estos receptores se verificó mediante un análisis de correlación con los valores de  $\log K_i$  de ambas especies y finalmente con un análisis de Northern en el cual se obtuvo hibridación del RNA de hepatocitos de estas especies con el cDNA correspondiente al subtipo  $\alpha_{1B}$ .

De esta manera se realizó la caracterización del subtipo de receptor  $\alpha_{1B}$ -adrenérgico presente en membranas de hígado de ratón, sin descartar la posibilidad de que otro subtipo pueda estar presente en una mínima cantidad, el cual no pudo ser identificado con la metodología empleada.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFIA

1. García-Sáinz, J. A. (1987). Hormonas: Mensajeros Químicos y comunicación celular. F.C.E., S.E.P., México.
2. Alberts Bruce., D. Bray., J. Lewis., M. Raff., K. Roberts. and J. D. Watson. (1989). Molecular Biology of the cell. 2ª Ed. Garland Publishing, Inc. New York.
3. Langley J.N. (1906) Proc. Roy. Soc. 78:170-194.
4. Limberg, B. and Starke, K (1983) Naunyn Schmiedebergs Arch. Physiol. 324:75-78.
5. Koshland, D. E. Jr., Nemethy G. and Filmer, D. (1966) Biochemistry 5:365-385.
6. Gilman, A. G. (1987) Annu. Rev. Biochem. 56:615-649.
7. Stryer, L. and Bourne, H. R. (1986) Annu. Rev. Cell Biol. 2:391-419.
8. Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A.M. (1990) Biochim. Biophys. Acta 1031:163.
9. Sternweis, P. C. and Smrcka, A. V. (1992) TIBS 17:502-506.
10. J. Iñiguez-Lluhi., C. Kleuss and A. G. Gilman (1993) Trends Cell Biol. 3:230-236.
- 11a. Rall, T. W., Sutherland, E. W. and Berthet, J. (1957) J. Biol. Chem. 224:464-471.
- 11b. Sutherland, E. W. (1972) Science 177:401-408.
12. Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1988) J. Biol. Chem. 263:4993-4998.
13. Isom, L. I., Cragoe, E. J. and Limbird, L. E. (1987) J. Biol. Chem. 262:6750-6757.
14. Hildebrandt, J. P., Codina, J. and Birnbaumer, L. (1984) J. Biol. Chem. 259:13178-13185.
15. Katada, T., Northrup, J. K., Bokoch, G. M., and Gilman, A. G. (1984) J. Biol. Chem. 259:3578-3585.

16. Cassel, D. and Pfeuffer, T. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:2669.
17. Holmgren, J. (1981) Nature 292:413.
18. García-Sainz, J. A. (1985) Ciencia 36:97.
19. Berridge, M. J. (1985) Scient. Amer. 253:142-152.
20. Taylor, S. S., Buechler, J. A. and Yonemato, W. (1990) Annu. Rev. Biochem. 59:971-1005.
21. Lehninger, A. (1982) Bioquímica. Omega. Barcelona. pp 117.
22. Litosh, I., Wallis, C. and Fain, J. N. (1985) J. Biol. Chem. 260:5464-5471.
23. Ariens, E. J. (1983) Pharm. Weekb. Scien. Ed. 5:121-127.
24. Hollenberg, M. D. and Cuatrecasas, P. (1979) en Receptor: General Principles and Procedures. R. O'Brien, eds. Plenum Press, New York. Vol. I, 193-214.
25. Taylor, S. J. and Exton, J. H. (1991) FEBS Lett. 286:214-216.
26. Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H. and Lee, S. Y. (1989) Science 244:546-550.
27. Volpe, P., Krause, K. H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldoles, J. and Lew, D.P. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:1091-1095.
28. Nishizuka, Y. (1986) Science 233:305-312.
29. Crabos, M., Imber, R., Woodtli, T., Fabbro, D. and Erne P. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 178:878-883.
30. Farago, A. and Nishizuka, Y. (1990) FEBS Lett. 268(2):350.
31. House, C. and Kemp, B. (1987) Science 238:1726.
32. Nishizuka, Y. (1988) Nature 334:661-665.
33. Kikkawa, U., Kishimoto, A. and Nishizuka, Y. (1989) Annu. Rev. Biochem. 58:31-44.
34. Nishizuka, Y. (1983) Trends Biochem Sci. 8:13.
35. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1982) J. Biol. Chem. 257:7847-7851.
36. Cochet, C., Gill, Y.N., Meisenhelder, J., Cooper, J. A. and Hunter, T. (1984) J. Biol. Chem. 259:2553-2558.

37. Brown, K. D., Blay, J., Irvine, R. F., Heslop, J. P. and Berridge, M. J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123:377-384.
38. Moon, S. K., Palfrey, H. C. and King, A. C. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 2298-2302.
39. Jacobs, S., Sahyoun, N. E., Saltiel, A. R. and Cuatrecasas, P. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6211-6213.
40. Leeb-hundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Lomasney, J. W., De Bernardis, J. F., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5651-5655.
41. Kishimoto, A., Takai, Y. and Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:7449-7452.
42. Corvera, S. and Garcia-Sainz, J. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119:1128-1133.
43. Lynch, C. J., Charest, R., Bocckino, S. B., Exton, J. H. and Blackmore, P. F. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2844-2851.
44. Copper, R. H., Coll, R. E. and Williamson, R. J. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:3281-3286.
45. Corvera, S., Schwarz, K. R., Graham, R. M. and Garcia-Sainz, J. A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:520-526.
46. Garcia-Sainz, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. T. and Tussié-Luna, M. I. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* 887:73-79.
47. Garcia-Sainz, J. A. and Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1987) *Eur. J. Biochem.* 163:417-421.
48. Ahlquist, R. P. (1948) *Am. J. Physiol.* 153:586-600.
49. Powell, C. E. and Slater, J. H. (1958) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 122:480-488.
50. Moran, N. C. and Perkins, M.E. (1958) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 124:223-237.
51. Furchgott, R. F. (1967) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 139:553-661.
52. Lands, A. M., Arnold, A., McAuliff, J. P., Luduena, F. P. and Brown, T. G. (1967) *Nature. London* 214:597-598.
53. Langer, S. Z. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 23:1793-1800.

54. U'Prichard, D. C., Greenberg, D. A. and Snyder, S. H. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13:454-473.
55. U'Prichard, D. C., Bectel, W. O., Rovot, B. M. and Snyder, S. H. (1979) *Mol. Pharmacol.* 16:47-60.
56. Motulsky, H. J., Shattil, S. J. and Insel, P. A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97:1562-1570.
57. Daiguji, M. H., Meltzer, H. Y. and U'Prichard, D. C. (1981) *Life Sci.* 28:2705-2717.
58. Berthelsen, S. and Pettinger, W. A. (1977) *Life Sci.* 21:595-606
59. Wikberg, J. E.S. (1979) *Acta Physiol. Scand (Suppl.)* 468:1-7.
60. Starke, K. and Langer S. Z., in *Presynaptic Receptors* (1979) Pergamon Press, Oxford pp 1-3.
61. Robinson, G. A., Butcher, R. W. and Sutherland, E. W. (1971) *Cyclic AMP* Academic Press. N. Y.
62. Jones, L. M. and Michell, R. H. (1978) *Biochem. Soc. Trans.* 6:672-688.
63. Fain, J. N. and Garcia-Sainz, J. A. (1980) *Life Sci.* 26:1183-1194.
64. Lomasney, J. W., Leeb-Lundberg, L. M. F., Cotecchia, S., Regan, J. W., DeBernardis, J. F., Caron, M. and Lefkowitz, R. J. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:7710-7716.
65. Kobilka, B. (1992) *Annu. Rev. Neurosci.* 15:87-114.
66. Ostrowski, J., Kjelsberg, M. A., Caron, M. G. and Lefkowitz, R. J. (1992) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:167-183.
67. Emorine, L. J., Marullo, S., Briend-Sutren, M-M., Patey, G., Tate, K., Delavier-Klutckho, C. and Strosberg, A. D. (1989) *Science* 245:1118-1121.
68. Nahmias, C., Blin, N., Elalouf, J. M., Mattei, M. G., Stroberg, A. D. and Emorine, L. J. (1991) *EMBO Journal* 10:3721-3727.
69. Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1095:127-139.

70. Morrow, A. L. and Creese, I. (1986) *Mol. Pharmacol.* 29:321-330.
71. Han, C. P., Abel, W. and Minneman, K. P. (1987) *Nature (London)*. 329:333-335.
72. Minneman, K. P., (1988) *Pharmacol. Rev.* 40:87-119.
73. Cotecchia, S., Schwinn, D. A., Randall, R. R., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Kobilka, B. K. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 85:7159-7163.
74. Schwinn, D. A., Lomasney, J. W., Lorenz, W., Szklut, P. J., Freneau, R.T., Yan-Feng, T. L., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Cotecchia, S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265:8183-8189.
75. Lomasney, J. W., Cotecchia, S. Lorenz, W., Leung, W-Y., Schwinn, D. A., Yang-Feng, T. L., Brownstein, M., Lefkowitz, R. J. and Caron, M. G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:6365-6369.
76. Schwinn, D. A., Page S. O., Middleton J. P., Lorenz W., Liggett S. B., Yamamoto K., Lapetina E. G., Caron M. G., Lefkowitz R. J. and Cotecchia S. (1991) *Mol. Pharmacol.* 40:619-626.
77. Perez, D. M., Piascik, M. T. and Graham, R. M. (1991) *Mol. Pharmacol.* 40:876-883.
78. Lefkowitz, R. J., Limbird, L. E., Mukherjee, C. and Caron, M. G. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 457:1-39.
79. Bentley, S. M., Drew, G. M. and Whiting, S. B. (1977) *Brit. J. Pharmacol.* 61:116-117.
80. U'Princhar, D. C., Charness, M. E., Robertson, D. and Snyder, S. S. (1978) *Eur. J. Pharmacol.* 50:87-89.
81. Wood, C. L., Arnett, C. D., Clarke, W. R., Tsai, B. S. and Lefkowitz, R. J. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28:1277-1282.
82. Han, C., Abel, P. W. and Minneman, K. P. (1987) *Mol. Pharmacol.* 32:505-510.
83. Gross, G., Hanft, G. and Rugevics, C. (1988) *Eur. J. Pharmacol.* 151:333-335.

84. Boer, R., Grasegger, A., Shudt, C. and Glossman H. (1989) Eur. J. Pharmacol. 172:131-145.
85. Grazladei, I., Zerning, G., Boer, R. and Glossman, H. (1989) Eur. J. Pharmacol. 172:329-337.
86. García-Sainz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcantara-Hernandez, R., Macias-Silva, M., Olivares-Reyes, A. and González-Espinosa, C. (1992a) Biochem. Biophys. Res. Comm. 186:760-767.
87. Neville, D. M. Jr. (1968) Biochim. Biophys. Acta 154:540-552.
88. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193:265-275.
89. P. J. Munson and D. Rodbard, (1980) Anal. Biochem. 107:220-239.
90. Cheng, Y. C., and Prusoff, W. F. (1979) Biochem. Pharmacol. 22:3099-3108.
91. Berry, M. N. and Friend, D. S. (1969). J. Cell. Biol. 43:506-520.
92. Chomczynski P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem. 162:156-159.
93. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning. A Laboratory Manual pp 7.10-7.21. Cold Spring Harbor Lab. New York.
94. Southern, E. M. (1975) J. Mol. Biol. 98:503-517.
95. Han, C. and Minneman, K. P. (1991) Mol. Pharmacol. 40:531-538.
96. Bylund, D. B., Blaxall, H. S., Iversen, L. J., Caron, M. G., Lefkowitz, R. J. and Lomasney, J. W. (1992) Mol. Pharmacol. 42:1-5.
97. García-Sainz, J. A., Romero-Avila, M. T., Alcantara-Hernandez, R. and Olivares-Reyes, A. (1993) Pharm. Commun. 2:339-344.
98. Bylund, D. B. (1992) FASEB J. 6:832-839.

99. Schwinn, D. A. and Lomasney, J. W. (1992) Eur. J. Pharmacol. 227:433-436.
100. García-Sainz, J. A., Villalobos-Molina, R., Corvera, S., Huerta-Bahena, J., Tsujimoto, G. and Hoffman, B. B. (1985) Eur. J. Pharmacol. 122:393-397.
101. Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, K. and Hashimoto, K. (1989) Mol. Pharmacol. 36:166-174.



0024-3205-(94)E0053-T

## CHARACTERIZATION OF THE HEPATIC $\alpha_{1B}$ -ADRENOCEPTORS OF RATS, MICE AND HAMSTERS

J. Adolfo García-Sáinz<sup>1</sup>, Patricia Casas-González, Ma. Teresa Romero-Avila and Claudia González-Espinosa

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

(Received in final form April 7, 1994)

### Summary

The  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in liver membranes from rats, hamsters and mice were characterized using [<sup>3</sup>H]prazosin. In the liver membranes from the three species a relatively large number of receptors was observed (500-900 fmol/mg of protein) and the affinities for [<sup>3</sup>H]prazosin were very similar (0.2-0.3 nM). Membrane preincubation with 10  $\mu$ M chloroethylclonidine markedly decreased [<sup>3</sup>H]prazosin binding and higher concentrations essentially abolished specific binding of this radioligand. Binding competition experiments indicated the following orders of potency: a) for agonists: oxymetazoline > epinephrine  $\geq$  norepinephrine  $\gg$  methoxamine and b) for antagonists: prazosin > WB 4101  $\geq$  phentolamine = benoxathian > 5-methyl urapidil. The affinity for (+)niguldipine was also low but there was variation between the three species. Total RNA obtained from the liver of these species hybridized with the  $\alpha_{1B}$ -adrenergic cDNA probe. The data suggest that these receptors correspond to the  $\alpha_{1B}$  subtype.

**Key Words:**  $\alpha_1$ -adrenoceptors, liver cells, hepatocytes

$\alpha_1$ -Adrenoceptors are a heterogeneous family of receptors constituted by, at least, four members. The existence of two subtypes, the  $\alpha_{1A}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, was initially suggested by pharmacological criteria (1,2). The  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor has been cloned and expressed (3). However, cloning of the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor has been elusive. Nevertheless, two other receptors of this family have been cloned, i. e. the  $\alpha_{1C}$ - and the  $\alpha_{1AD}$ -adrenoceptors (4-7).

Interestingly, it has been observed that there is considerable variation in the subtype of  $\alpha_1$ -adrenoceptor expressed in liver cells of different species (8). Thus, rat hepatocytes express  $\alpha_{1B}$ - (8-10), rabbit hepatocytes  $\alpha_{1C}$ - (8,11) and guinea pig hepatocytes  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptors (8,12).  $\alpha_1$ -Adrenoceptors have been identified, using [<sup>3</sup>H]prazosin, in liver membranes from different species, including hamsters and mice (13). However, no detailed characterization of the  $\alpha_1$ -adrenergic

<sup>1</sup> Corresponding author: J. A. García-Sáinz, Inst. Fisiol. Cel. UNAM, Apdo. Postal 70-248, 04510 México D.F.

subtype present in the liver of these species has been reported, and it is here presented. Our results suggest that hamsters and mice express  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors. The pharmacological profiles of these receptors were compared to that of the rat liver  $\alpha_1$ -adrenoceptors, which seem to be prototypic for this subtype.

### Materials and Methods

(-)Epinephrine, (-)norepinephrine, oxymetazoline and prazosin were obtained from Sigma Chemical Co. Benoxathian, 5-methyl urapidil, chloroethylclonidine, and WB 4101 were from Research Biochemicals Inc. Phentolamine (Ciba-Geigy), methoxamine (Burroughs Wellcome) and (+)niguldipine (Byk Gulden) were generous gifts from the indicated pharmaceutical companies. [ $^3$ H]Prazosin (72.2 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear.

Partially purified liver plasma membranes, from male syrian hamsters (90-120 g), CD1 mice (25-30 g) and Wistar rats (200-220 g) were obtained by the method of Neville (14) up to step 11 (homogenization in alkaline hypotonic buffer, low speed centrifugation and separation by flotation in a discontinuous sucrose density gradient). Membranes were washed and resuspended in the buffer used for the binding studies (50 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.5). Binding studies were performed by incubating membranes (100-200  $\mu$ g) with the radioactive ligand, alone or with the indicated agents, in a total volume of 0.25 ml for 30 min in a water bath shaker at 25°C. At the end of the incubation, 10 ml of ice-cold buffer were added to the membrane suspension, the membranes were immediately filtered on GF/C filters and washed three-times (10 ml each time) with the same buffer. Saturation experiments were performed using concentrations in the range of 0.05-15 nM [ $^3$ H]prazosin and binding competition studies with 0.8-1.0 nM of the radioactive ligand (70-80% receptor occupation). Non-specific binding was evaluated in the presence of 10  $\mu$ M phentolamine; specific binding represented 80-90% of the total binding at the K<sub>D</sub>. Binding saturation and competition data were analyzed using the EBDA and LIGAND (15) programs (Biosoft-Elsevier). Two-state fits were utilized only when this more complex model significantly improved the goodness of the fit. K<sub>i</sub> values were calculated according to Cheng and Prusoff (16). Protein was quantified by the method of Lowry et al (17) using bovine serum albumin as standard.

Total RNA was obtained by the method of Chomczynski and Sacchi (18) with minor modifications. Northern analysis was performed using standard high stringency conditions (19) as described before (8).

### Results and Discussion

As it has been shown in many systems the binding of [ $^3$ H]prazosin to liver membranes was rapid, reversible, saturable and with high affinity. In the liver membranes from the three species studied a relatively large number of receptors was observed (500-900 fmol/mg of protein) and the affinities for [ $^3$ H]prazosin were very similar (0.2-0.3 nM). Representative saturation isotherms are presented in Fig. 1 and the values are given in Table I. As it can be observed in Fig. 1, the Rosenthal analysis of the saturation isotherms was linear, consistent with the binding of [ $^3$ H]prazosin to sites with homogeneous affinity for this ligand.

Among the agents that have been particularly useful for the characterization of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes, is chloroethylclonidine (2). This alkylating antagonist irreversibly inactivates  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1C}$ -adrenoceptors but not those of the  $\alpha_{1A}$  subtype (2,4). In order to test the sensitivity to this antagonist, membranes were pre-incubated for 10 min, at 37°C, in binding buffer and in the absence or presence of 10  $\mu$ M chloroethylclonidine. After this treatment, membranes were diluted

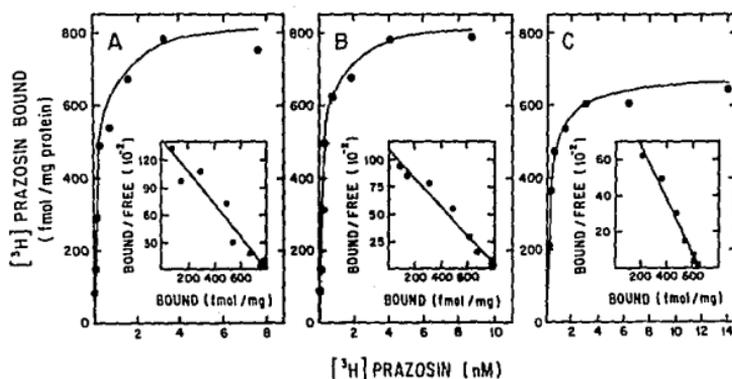


Fig. 1

REPRESENTATIVE [ $^3\text{H}$ ]PRAZOSIN SATURATION ISOTHERMS USING LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS AND MICE. Plotted are the specific bindings and in the inserts the Rosenthal analysis are shown. The figures are representative of 3-6 experiments using different membrane preparations. A, rat liver membranes; B, hamster liver membranes; C, mouse liver membranes.

TABLE I

BINDING PARAMETERS FROM [ $^3\text{H}$ ]PRAZOSIN SATURATION EXPERIMENTS WITH LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS AND MICE.

Treatment	$K_D$ (nM)	$B_{max}$ (fmol/mg)
Rat:		
None	$0.22 \pm 0.09$	$868 \pm 30$
Pre-incubated alone	$0.29 \pm 0.18$	$635 \pm 93$
" with CEC	$0.17 \pm 0.08$	$234 \pm 31$
Hamster:		
None	$0.29 \pm 0.02$	$824 \pm 5$
Pre-incubated alone	$0.34 \pm 0.04$	$579 \pm 109$
" with CEC	$0.29 \pm 0.06$	$203 \pm 36$
Mouse:		
None	$0.29 \pm 0.03$	$554 \pm 39$
Pre-incubated alone	$0.37 \pm 0.02$	$464 \pm 56$
" with CEC	$0.41 \pm 0.02$	$109 \pm 8$

Results are the means  $\pm$  S.E.M. of 3-6 experiments in each case using different membrane preparations. CEC, chloroethylclonidine.

with cold buffer, washed twice by centrifugation-resuspension and [ $^3$ H]prazosin saturation experiments performed. It can be observed in Table I that preincubation by itself decreased the  $B_{max}$  in membranes (15-30%) from the three species. This is probably due to loss, during the washing, of light vesicles enriched in receptors. However, it is clear that the incubation with chloroethylclonidine markedly reduced the number of receptors (65-75% decreases in  $B_{max}$  when compared to membranes pre-incubated without chloroethylclonidine) without altering their affinities for prazosin (Fig. 2 and Table I). In some other experiments, membranes were incubated for a longer time (30 min) and with a higher concentration of chloroethylclonidine (100  $\mu$ M); under these conditions, the specific binding of [ $^3$ H]prazosin essentially disappeared (data not shown).

The pharmacological profile of these binding sites was studied by performing binding competition experiments with agonists and antagonists. These data are presented in Figs. 3 and 4 and in Table II. It was observed that for the liver membranes of the three species the order of potency for agonists was: oxymetazoline > epinephrine  $\approx$  norepinephrine  $\gg$  methoxamine. In fact, the  $K_i$  values for these agonists, in membranes from the three species, were very similar (Table II). These agonists were studied since epinephrine and norepinephrine are the natural catecholamines acting on these receptors and because differences in affinity and activity on the different  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes have been observed with oxymetazoline and methoxamine (7, 20, 21). The relatively low affinity for the latter two agonists suggested that these adrenoceptors belong to the  $\alpha_{1D}$  subtype. Hill slopes varied between 0.75 and 1.

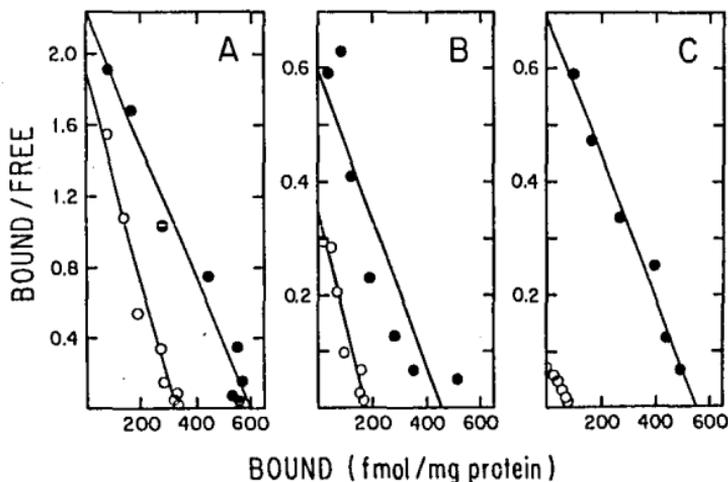


Fig. 2

EFFECT OF PREINCUBATION WITH CHLOROETHYLCLONIDINE ON THE [ $^3$ H]PRAZOSIN BINDING USING LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS, AND MICE. Plotted are the Rosenthal analysis of saturation isotherms of membranes pre-incubated in the absence (filled circles) or presence of 10  $\mu$ M chloroethylclonidine (unfilled circles). The figures are representative of 3-6 experiments using different membrane preparations. A, rat liver membranes; B, hamster liver membranes; C, mice liver membranes.

TABLE II  
AFFINITIES OF ADRENERGIC AGENTS FOR  $\alpha_1$ -ADRENOCEPTORS OF  
LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS AND MICE.

Agent	Rat K <sub>i</sub>	Hamster K <sub>i</sub>	Mouse K <sub>i</sub>
<b>AGONISTS (<math>\mu</math>M):</b>			
Oxymetazoline	1.23 $\pm$ 0.21 (4)	0.82 $\pm$ 0.09 (3)	0.76 $\pm$ 0.08 (4)
Epinephrine	2.18 $\pm$ 0.11 (4)	1.35 $\pm$ 0.07 (3)	1.85 $\pm$ 0.04 (3)
Norepinephrine	4.37 $\pm$ 0.92 (4)	2.20 $\pm$ 0.35 (3)	3.29 $\pm$ 0.15 (3)
Methoxamine	261 $\pm$ 25 (4)	165 $\pm$ 50 (4)	253 $\pm$ 36 (4)
<b>ANTAGONISTS (nM):</b>			
Prazosin	0.76 $\pm$ 0.09 (3)	0.62 $\pm$ 0.18 (3)	---
WB-4101	18 $\pm$ 3 (3)	16 $\pm$ 3 (3)	4 $\pm$ 1 <sup>b</sup> (9)
Phentolamine	60 $\pm$ 10 (3)	43 $\pm$ 11 (3)	28 $\pm$ 4 (5)
Benoxathian	73 $\pm$ 20 (3)	60 $\pm$ 4 (3)	16 $\pm$ 3 <sup>c</sup> (6)
5-Methylurapidil	262 $\pm$ 62 (3)	169 $\pm$ 33 (3)	109 $\pm$ 24 (6)
(+)Niguldipine	171 $\pm$ 9 <sup>a</sup> (3)	34 $\pm$ 11 (3)	10 $\pm$ 2 (6)

Results are the means  $\pm$  S.E.M. with the number of experiments in parentheses. ANOVA :

<sup>a</sup>  $p < 0.001$  vs data using hamster and mouse membranes; <sup>b</sup>  $p < 0.001$  vs data using hamster and rat membranes; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs data using hamster and rat membranes.

The slopes of the competition curves obtained with antagonists varied between 0.90 and 1, indicating that the sites labeled with [<sup>3</sup>H]prazosin are essentially homogeneous. An exception to this were the binding competition curves with prazosin using mice liver membranes. In this case, the slopes of the competition curves were consistently less than 1 (0.6-0.85) (Fig. 4). LIGAND analysis of these data indicated that the competition curve with prazosin in mice liver membranes was best fitted to a two-site model. A high affinity site ( $K_{i1}$  8.6  $\pm$  2.9 pM; mean  $\pm$  S.E.M., n=8) and a low affinity site ( $K_{i2}$  1.3  $\pm$  0.6 nM; mean  $\pm$  S.E.M., n=8) were observed. The affinity of the latter site is within what has been observed for the interaction of prazosin with  $\alpha_1$ -adrenoceptors, but the high affinity site is several orders of magnitude below. We have no clear explanation for this anomalous behavior. However, it should be mentioned that prazosin displaced [<sup>3</sup>H]prazosin beyond all other antagonists.

The order of potency observed for antagonists for the three species was: prazosin > WB 4101  $\geq$  phentolamine = benoxathian > 5-methyl urapidil. It is worth mentioning that it has been observed

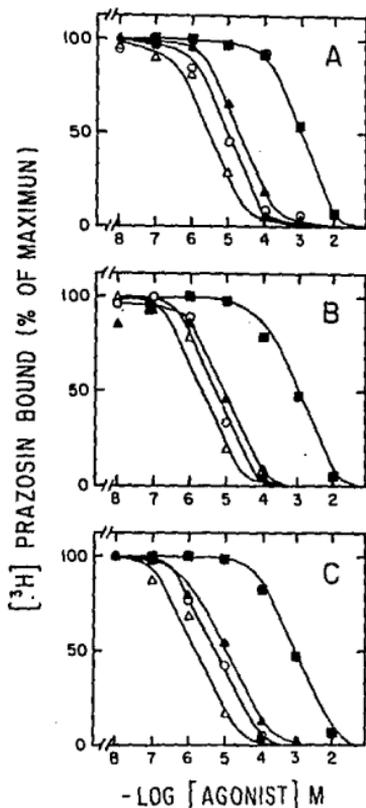
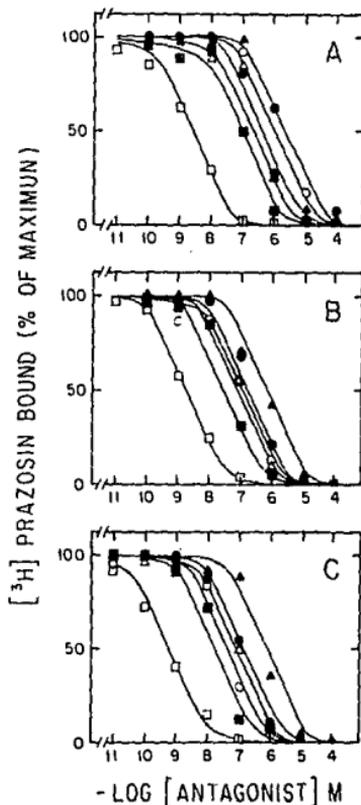


Fig. 4  
 REPRESENTATIVE ANTAGONIST BINDING COMPETITION EXPERIMENTS USING LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS AND MICE. Prazosin, unfilled squares; WB 4101, filled squares; benoxathian, filled circles; phentolamine, unfilled triangles; (+)niguldipine, unfilled circles; 5-methyl urapidil, filled triangles. The figures are representative of 3-6 experiments using different membrane preparations. A, rat liver membranes; B, hamster liver membranes; C, mice liver membranes.

Fig. 3  
 REPRESENTATIVE AGONIST BINDING COMPETITION EXPERIMENTS USING LIVER MEMBRANES FROM RATS, HAMSTERS AND MICE. Oxymetazoline, unfilled triangles; epinephrine, unfilled circles; norepinephrine, filled triangles; methoxamine, filled squares. The figures are representative of 3-6 experiments using different membrane preparations. A, rat liver membranes; B, hamster liver membranes; C, mice liver membranes.



that (+)niguldipine, WB 4101, 5-methyl urapidil and benoxathian have high affinity for the  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor and much lower affinity for receptors or the  $\alpha_{1B}$  subtype (1,7,20-25). The observed  $K_i$  values for the antagonists were similar in the membranes from the three species studied, although the absolute  $K_i$  values for WB 4101 and benoxathian were lower in mice liver membranes than in those from the other species (Table II). In the case of (+)niguldipine we observed higher affinity in liver membranes from mice and hamsters than in those from rats (Table II). Such variation in affinity for (+)niguldipine has been previously observed for receptors of the same subtype and it has been attributed to its very high lipophilicity (23). It is possible that membranes from different species contain different amounts or types of lipids; this could lead to different degrees of membrane partitioning which could modify the apparent receptor affinity. Nevertheless, even in membranes from mice, the observed  $K_i$  was relatively large and within the range observed for  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors (22,23). It should be mentioned, that the substitution of a single aminoacid can perturb the binding site for one agent or for a series of ligands (see for example the elegant work in ref. 26) and that, therefore, pharmacological difference between receptor homologues is not unexpected.

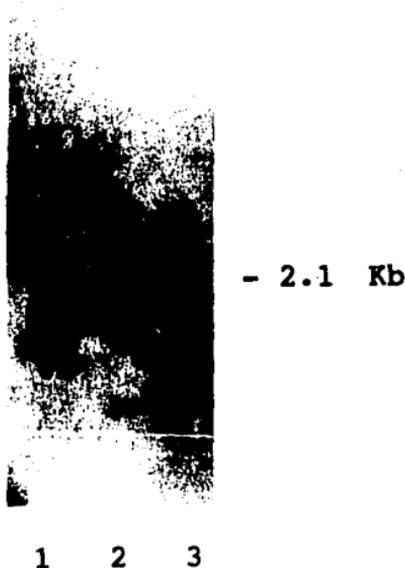


Fig. 5  
NORTHERN ANALYSIS. RNA from rat (lane 1), hamster (lane 2) and mouse (lane 3) livers were hybridized with the  $\alpha_{1B}$  probe.

Using total RNA extracted from the liver of the different species we performed Northern analysis using  $\alpha_{1B}$  (3),  $\alpha_{1C}$  (4) and  $\alpha_{1AD}$  (5,7) cDNA selective probes. We observed that the RNA from the three species hybridized with the  $\alpha_{1B}$  probe (Fig. 5); it should be mentioned, however, that if the filters are exposed for long time some weak signal was also observed with the  $\alpha_{1AD}$  probe. We have been unable to see any signal with the  $\alpha_{1C}$  probe in these species.

In summary, our data indicate that  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors are the main  $\alpha_1$ -adrenoceptor present in the liver of rats, hamsters and mice. The possibility that other  $\alpha_1$ -subtype could be present can not be ruled out. However, such adrenoceptors, if present, are a small fraction of the total  $\alpha_1$ -adrenoceptors in these membranes and were not clearly evidenced by the methods employed.

#### Acknowledgements

The authors express their gratitude to Ms. Guadalupe Ramírez for skillfully typing the manuscript, Mr. J.M. Barbosa for his help with the computer programs and MVZ Ignacio Cabrera and MVZ Héctor Malagón for their help with the animals. This research was partially supported by Grants from DGAPA (IN200193) and CONACyT (0310-N9107).

#### References

1. L.A. MORROW and I. CREESE, *Mol. Pharmacol.* **29** 321-330 (1986).
2. K.P. MINNEMAN, *Pharmacol. Rev.* **40** 87-119 (1988).
3. S. COTECCHIA, D.A. SCHWINN, R.R. RANDALL, R.J. LEFKOWITZ, M.G. CARON and B.K. KOBILKA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** 7159-7163 (1988).
4. D.A. SCHWINN, J.W. LOMASNEY, W. LORENZ, P.J. SZKLUT, R.T. FRAMEAU Jr., T.L. YANG-FENG, M.G. CARON, R.J. LEFKOWITZ and S. COTECCHIA, *J. Biol. Chem.* **265** 8183-8189 (1990).
5. J.W. LOMASNEY, S. COTECCHIA, W. LORENZ, W.-Y. LEUNG, D.A. SCHWINN, T.L. YANG-FENG, M. BROWNSTEIN, R.J. LEFKOWITZ and M.G. CARON, *J. Biol. Chem.* **266** 6365-6369 (1991).
6. D.M. PEREZ, M.T. PIASCIK and R.M. GRAHAM, *Mol. Pharmacol.* **40** 876-883 (1991).
7. D.A. SCHWINN and J.W. LOMASNEY, *Eur. J. Pharmacol.* **227** 433-436 (1992).
8. J.A. GARCÍA-SÁINZ, M.T. ROMERO-AVILA, R. ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ, M. MACÍAS-SILVA, A. OLIVARES-REYES and C. GONZÁLEZ-ESPINOSA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186** 760-767 (1992).
9. C. HAN, P.W. ABEL and K.P. MINNEMAN, *Mol. Pharmacol.* **32** 505-510 (1987).
10. M.E. TORRES-MÁRQUEZ, R. VILLALOBOS-MOLINA and J.A. GARCÍA-SÁINZ, *Eur. J. Pharmacol.* **206** 199-202 (1991).
11. D.A. SCHWINN, S.O. PAGE, J.P. MIDDLETON, W. LORENZ, S.B. LIGGETT, K. YAMAMOTO, E. G. LAPETINA, M.G. CARON, R.J. LEFKOWITZ and S. COTECCHIA, *Mol. Pharmacol.* **40** 619-626 (1991).
12. J.A. GARCÍA-SÁINZ, M.T. ROMERO-AVILA, J.A. OLIVARES-REYES and M. MACÍAS-SILVA, *Eur. J. Pharmacol.* **227** 239-245 (1992).
13. S.J. SULAKHE, V.B. PULGA and S. TRAN, *Mol. Cell. Biochem.* **83** 81-88 (1988).
14. D.M. NEVILLE, Jr. *Biochim. Biophys. Acta* **154** 540-552 (1968).
15. P.J. MUNSON and D. RODBARD, *Anal. Biochem.* **107** 220-239 (1980).
16. Y.-C. CHENG and W.H. PRUSOFF, *Biochem. Pharmacol.* **22** 3099-3108 (1973).
17. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193** 265-275 (1951).
18. P. CHOMCZYNSKI and N. SACCHI, *Anal. Biochem.* **162** 156-159 (1987).
19. T. MANIATIS, E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* pp 7.10-7.21. Cold Spring Harbor Lab. New York. (1982).
20. J.A. GARCÍA-SÁINZ, R. VILLALOBOS-MOLINA, S. CORVERA, J. HUERTA-BAHENA, G. TSUJIMOTO and B.B. HOFFMAN, *Eur. J. Pharmacol.* **112** 393-397 (1985).
21. J.A. GARCÍA-SÁINZ, M.T. ROMERO-AVILA, R. ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ and A.

- OLIVARES-REYES, *Pharm. Commun.* **2** 339-344, (1993).
22. C. HAN and K.P. MINNEMAN, *Mol. Pharmacol.* **40** 531-538 (1991).
23. R. BOER, A. GRASSEGGER, C. SCHUDT and H. GLOSSMANN, *Eur. J. Pharmacol.* **172** 131-145 (1989).
24. G. GROSS, G. HANFT and C. RUGEVICS, *Eur. J. Pharmacol.* **151** 333-335 (1988).
25. A.D. MICHEL, D. N. LOURY and R. L. WHITING, *Br. J. Pharmacol.* **98** 883-889 (1989).
26. D. OKSENBERG, S.A. MASTERS, B.F. O'DOWD, H. JIN, S. HAVLIK, S. J. PEROUTKA and A. ASHKENAZI, *Nature* **360** 161-163 (1992).