

69
A1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
CLONACION DEL RECEPTOR ~~FAC. DE QUIMICA~~ **ENERGICO**
PRESENTE EN LOS HEPATOCITOS DE CUYO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
DIANA GONZALEZ ESPINOSA



MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

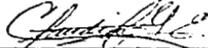
Jurado asignado:

Presidente Profra. Medina Jiménez Beatriz Albina
Vocal: Profr. Hernández Montes Homero
Secretario: Profra. Vázquez Alvarez Ana Marfa
1er. Suplente: Profra. Naranjo Rodríguez Elisa Brosla
2do. Suplente: Profra. Romero Avila Marfa Teresa

Sitio donde se desarrolló el tema:

Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
Laboratorio 303-sur. Departamento de Biología Celular.

Asesor del tema:



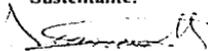
Dra. Claudia González Espinosa

Supervisor Técnico:



Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz

Sustentante:



Diana González Espinosa

**Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular,
bajo la dirección de la Dra. Claudia González Espinosa y la
asesoría técnica del Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz, con
apoyo por parte de la DGAPA (IN200596).**

Dedicatorias

A mis papás, Ricardo y Esperanza con todo mi amor; porque todo lo que soy se los debo a ellos.

A mis hermanos, Claudia, Kathyi, Nadya y Ricardo con todo mi cariño; porque juntos somos invencibles.

A la Dra. Claudia González, por haberme enseñado a entender un mundo en donde para conocerlo, se necesitan más que los ojos.

A mis niños: Ricardo, Alejandro y al nuevo bebé, por ser la alegría de toda mi familia.

A Hugo Garrido, por esa deuda de amistad y cariño; gracias.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Adolfo García-Sáinz, por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y por ser ejemplo de una vida dedicada no a encontrar la verdad, sino a entenderla.

A los Doctores Beatriz Medina, Homero Hernández y Ana María Vázquez, jurado revisor del presente trabajo, porque todas sus sugerencias y comentarios siempre fueron enriquecedoras.

A la DGAPA por el apoyo económico brindado para la realización del presente trabajo.

A Mayra Aparicio, por su alegría y amistad eternas.

A Dulce María López, por contagiarme su fuerza y alegría de vivir.

A mis compañeros de laboratorio: Rocío Alcántara, Patricia Casas, Mario Cruz, Agustín García, Luz del Carmen Medina y María Elena Torres por crear una atmósfera agradable para trabajar y toda la ayuda y consejos recibidos.

A Artemio Mendoza, por su ayuda siempre incondicional en el uso de los programas de cómputo y permitirme emplear algunas de sus figuras en este trabajo.

A Ma. Teresa Romero y Alberto Olivares; por todo lo que aprendimos juntos en el trabajo diario.

A los Doctores José Vázquez y Claudia González, porque siempre tuvieron tiempo para enseñarme.

Al M.en C. Alejandro Padilla; por guiarme siempre hacia la dirección correcta.

A mis amigos de la Facultad, Araceli Sánchez, Iliana James, Ingrid Neyra, Lourdes Cervantes, Arturo Calderón, Eduardo Infante, Ricardo Rajsbaum y Alberto Gómez, por todas esas horas de trabajo y amistad compartidas.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, porque con su confianza me enseñó a creer en mis manos.

Al Maestro Raúl Garza Velasco por el servicio extraordinario que presta a los alumnos en la Facultad de Química.

**"... porque trato de ganar hacia adentro en profundidad
lo que siento imposible abarcar
en extensión..."**

Gilberto Owen

INDICE

	Página
Introducción	1
Antecedentes	17
Objetivos	26
Materiales y Métodos	27
Resultados	45
Discusión	53
Conclusiones	60
Apéndice	62
Bibliografía	64

RESUMEN

Los receptores α_1 adrenérgicos están acoplados principalmente al sistema de transducción de recambio de fosfomofidos-calcio, mediando así un gran número de efectos fisiológicos. En nuestro laboratorio se han clasificado en función a sus afinidades por diversos compuestos, los subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos presentes en los hepatocitos de distintas especies, encontrando sorprendentemente que éstos no son los mismos para cada una de ellas; así se encontró que en los hepatocitos de rata, hamster, ratón, pollo y pez se expresa el subtipo α_{1D} , mientras que en el gato, perro, conejo y humano el subtipo resultó ser α_{1A} . Así mismo se encontró que en el mono rhesus se encuentran coexpresados los subtipos α_{1A} y α_{1D} .

En el cuyo, el subtipo de receptor presente en los hepatocitos, caracterizado por medición de parámetros funcionales, es el α_{1A} . Sin embargo, ensayos tipo "Northern blot" indican la presencia de un mensajero para el subtipo α_{1D} . Debido a la inconsistencia existente entre estos resultados, el presente trabajo de tesis consistió en llevar a cabo la caracterización molecular del subtipo de receptor α_1 adrenérgico que se expresa en los hepatocitos del cuyo. Esta caracterización se logró gracias a la clonación de regiones específicas pertenecientes a distintas regiones del cDNA que codifica para este receptor, empleando tanto oligonucleótidos ya reportados en la literatura para la amplificación específica de regiones pertenecientes al subtipo ya caracterizado (α_{1A}), así como de oligonucleótidos sintetizados *ex profeso* para la amplificación de la región codificante completa del cDNA.

Al establecer condiciones experimentales para la amplificación de dichas regiones, se observó la degradación diferencial del mensajero para el subtipo α_{1A} en muestras de RNA obtenidas a partir de hepatocitos recién aislados, así como la inducción de la transcripción del mensajero para el subtipo α_{1A} conforme el proceso de aislamiento de las células avanza.

Ya que el RNA mensajero para el receptor α_{1A} no se modifica cuando se extrae de muestras del hígado completo, se utilizó este RNA para clonar en un vector plasmídico, distintas zonas del receptor. Utilizando la técnica de RT-PCR se logró la amplificación de 3 fragmentos (316, 630 y 1373 pb) los cuales hibridan en condiciones de alta estrictividad con una sonda específica para el subtipo α_{1A} .

La secuencia parcial de uno de ellos (316 pb) tiene una similitud con el cDNA que codifica para el subtipo α_{1A} clonado de bovino del 94% con la secuencia de nucleótidos y del 88% en secuencia de aminoácidos.

Se clonó el fragmento de 1373 pb, el cual contiene la región codificante completa para este receptor. Estos datos moleculares comprueban que el tipo de receptor α_1 adrenérgico que se expresa en los hepatocitos de cuyo es del subtipo A.

INTRODUCCION

1.- Las células se comunican.

Cada célula que forma parte de los organismos pluricelulares esta programada durante su desarrollo para responder a una serie de señales específicas que actuando coordinadamente, regulan el comportamiento de la misma, incluyendo señales para permanecer en inertiase con un metabolismo reducido, para dividirse o para morir. Las células como sistemas biológicos fundamentales, son capaces de percibir cambios en el ambiente y modificar su fisiología ya sea para "adaptarse" a las nuevas condiciones y sobrevivir, así como para completar su ciclo de vida el que involucra: su división, crecimiento, diferenciación e incluso la muerte.

Por lo tanto la comunicación celular requiere de moléculas que actúen como mensajeros (hormonas y neurotransmisores) y de un sistema metabólico presente en los tejidos blanco que le permitan responder de manera característica y programada a diferentes estímulos .

La célula después de recibir el mensaje debe transmitirlo hacia el interior, para encender los mecanismos metabólicos que le permitan dar respuesta a dicho mensaje. Al *proceso* mediante el cual la señal extracelular es convertida en intracelular, es denominado *transducción*.

Para que se lleve a cabo el proceso de transducción, además de moléculas que actúen como mensajeros, es necesaria la existencia de moléculas que sean capaces de reconocerlos, esto es, moléculas que permitan asociar el proceso de reconocimiento del mensajero con las moléculas efectoras responsables de generar los cambios fisiológicos.

A las moléculas que actúan como mensajeros químicos, se les ha clasificado en función al alcance de su efecto (1) como: a) **mediadores locales o autacoides**, que actúan sobre células blanco muy próximas (comunicación paracrina), o sobre ellas mismas

(comunicación autoerina); b) **hormonas** que son liberadas por un tejido especializado (glándulas) al torrente circulatorio y por lo tanto su espectro de acción es mucho más amplio (comunicación endocrina) y c) **neurotransmisores**, liberados principalmente por las células nerviosas las cuales forman uniones especializadas denominadas *sinapsis* y cuya acción es de alcance limitado, debido a que la comunicación se establece sólo entre la célula "emisora" (presináptica) y la "receptora" o célula postsináptica.

La forma en la que cada uno de estos mensajeros actúan, está determinada por su naturaleza química (2). Los mensajeros de tipo lipídico, incluidos los esteroides, las hormonas tiroideas y los retinoides, difunden a través de la membrana plasmática de la célula blanco y activan a proteínas receptoras intracelulares, las cuales regulan directamente la transcripción de genes específicos. Existen otras sustancias como el óxido nítrico y el monóxido de carbono que al estar disueltos en el medio difunden también, a través de la membrana plasmática y pueden activar enzimas intracelulares, generando así una respuesta fisiológica. Sin embargo la mayor parte de las moléculas extracelulares que sirven como mensajeros son hidrofílicas (mensajeros de naturaleza peptídica y aminas) las que son capaces de activar receptores, sobre la superficie de la célula blanco.

Las moléculas capaces de reconocer el mensaje e iniciar el proceso de transducción de la señal son denominados receptores. Estos llevan a cabo dos funciones fundamentales en dicho proceso: unen al mensajero químico y transmiten la señal hacia el interior de la célula.

La unión de la hormona al receptor es altamente específica debido a su complementariedad estereoquímica, es además rápida y reversible. La velocidad de asociación y de disociación del complejo hormona-receptor depende de la temperatura y el pH.

Se sabe también, que el número de receptores en la superficie de una célula es limitado y por lo tanto la capacidad de unión es saturable, sin embargo, se ha demostrado que

algunos mensajeros pueden ser reconocidos no por un tipo, sino por diversos tipos de receptores y esto puede ocurrir para la misma hormona en un mismo tejido.

Los receptores, además de unir al mensajero natural, pueden también unir agentes farmacológicos capaces de modificar su estructura ya sea bloqueándolo, a los que se les ha llamado antagonistas, o bien activándolo, entonces se les llama agonistas y así, se ha podido realizar una clasificación con base al orden de afinidad que presentan por los compuestos anteriores. Estos agentes pueden diferir del mensajero natural, tanto en afinidad (grado de asociación entre el ligando y el receptor) y en actividad intrínseca (capacidad de la hormona para producir una respuesta biológica).

Con el descubrimiento de receptores mutados que permanecen constitutivamente activos, esto es, que activan el proceso de transducción en ausencia de agonista, se ha postulado un modelo en donde, en forma similar a los canales iónicos que espontáneamente isomerizan entre un estado cerrado (inactivo) o abierto (activo), los receptores existen en dos estados termodinámicamente interconvertibles, uno activo y uno inactivo.(3) En este modelo el agonista se une con mayor afinidad al estado activado, lo que estabiliza esta conformación y permite el inicio del proceso de transducción.

La unión de la hormona al receptor inicia una cadena de eventos bioquímicos que termina con la producción de una sustancia capaz de alterar el funcionamiento celular, a la que se le ha denominado segundo mensajero. Una vez que éste se genera, es reconocido por proteínas intracelulares, que conducen a cambios en el funcionamiento celular.

Los receptores pueden ser clasificados de acuerdo a su localización celular en receptores membranales e intracelulares, que a su vez pueden ser citoplasmáticos o nucleares.

Con base en su actividad los receptores membranales se clasifican en :

1.- Receptores tipo canal. Tienen la capacidad de abrirse o modificarse cuando se produce la interacción ligando-receptor.

2.- Receptores con actividad enzimática.

3.- Receptores acoplados a proteínas G. (Es a este grupo al que pertenecen todos los tipos de receptores adrenérgicos).

2.-¿ Por qué estudiamos a la adrenalina ?

El sistema nervioso autónomo, denominado también vegetativo o involuntario está representado anatómicamente por nervios, ganglios y plexos que proveen de inervación a órganos internos como el corazón , el bazo y el hígado, así como a los vasos sanguíneos, algunas glándulas y la musculatura lisa. Este sistema regula funciones autónomas, es decir aquellas que ocurren sin control consciente como son la respiración, la circulación, la digestión, la temperatura corporal , el metabolismo y la secreción endocrina.

Este sistema se divide en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático. Una de las principales diferencias anatómicas entre estos dos sistemas es que la inervación de tipo simpática está ampliamente distribuida y los sistemas efectores están muy inervados, mientras que las fibras de inervación parasimpática están mucho más limitadas en distribución y por lo tanto su acción es mucho más localizada.

El sistema parasimpático funciona principalmente por descargas discretas y focalizadas y está asociado de manera primordial a la conservación de energía y al mantenimiento de la función de los órganos durante períodos de mínima actividad. El sistema simpático se asocia con la médula adrenal y bajo condiciones de estrés las funciones simpáticas se encargan de mantener la homeostasis corporal mediante la acción de medidas compensatorias.

La activación del sistema simpático ocurre entonces en respuesta a diversos estímulos, incluidos la actividad física, el estrés psicológico, la pérdida sanguínea y muchas otras alteraciones normales y patológicas sobre el organismo.

Las respuestas fisiológicas y metabólicas seguidas a la estimulación de los nervios simpáticos en los mamíferos están mediadas principalmente por el neurotransmisor norepinefrina. Como parte de la respuesta al estrés, la médula adrenal es estimulada, lo que trae como consecuencia la elevación de la concentración de adrenalina en la circulación.

Esta hormona actúa en sitios distantes al de su liberación. Las acciones del sistema simpático sobre el sistema nervioso central están mediadas tanto por el neurotransmisor noradrenalina como por una molécula denominada dopamina, que actúa sobre receptores distintos a los adrenoreceptores, o receptores para la adrenalina.

Mecanismos tales como el aumento en la frecuencia cardíaca, la elevación de la presión sanguínea, el incremento de las concentraciones de glucosa y lactato en sangre, el aumento del flujo sanguíneo hacia capilares de la piel, el aumento en la concentración de ácidos grasos en circulación, así como la dilatación de pupilas y bronquios, son algunos efectos mediados primordialmente o reforzados por la acción de la hormona adrenalina y es debido a la acción pleiotrópica de esta hormona sobre el organismo, lo que la reviste de una gran importancia a nivel terapéutico. Esta hormona tiene una gran variedad de usos clínicos.

En general, todos estos usos están relacionados con su acción sobre los vasos sanguíneos, el corazón y la musculatura bronquial. Se emplea como agente broncodilatador en crisis asmáticas y también para restablecer a pacientes con arritmia cardíaca. Actualmente se han logrado obtener sustancias antagonistas a la acción de esta hormona, permitiendo entre muchos otros ejemplos, el control de pacientes cardiopatas y asmáticos.

Debido a lo anterior, es que resulta de gran importancia estudiar los mecanismos moleculares mediante los cuales esta hormona ejerce sus acciones. (Fig.1)

Como se ha mencionado anteriormente , la hormona adrenalina media muchos efectos fisiológicos en tejidos blanco distintos. Esta variedad de efectos son posibles gracias a la existencia de diversos tipos de receptores para esta hormona que además, se encuentran acoplados a sistemas de transducción diferentes y cuyo número y distribución tisular generan la respuesta global observada en cada uno de estos tejidos hacia la acción adrenérgica.

3.- Receptores adrenérgicos.

Desde 1948, estudios farmacológicos en tejidos aislados, permitieron la identificación de dos tipos de receptores adrenérgicos, que fueron designados por Ahlquist como receptores alfa (α) y beta (β). (6)

El desarrollo de compuestos más selectivos y el uso de técnicas de DNA recombinante han permitido la identificación de tres tipos de receptores adrenérgicos, cada uno con, al menos, tres subtipos relacionados .

Existen tres familias de adrenoreceptores, las familias α_1 , α_2 y la β . Estas familias han sido subdivididas de acuerdo con su homología en secuencia, su grado de afinidad por diversos compuestos y al mecanismo de transducción al cual están acoplados. La homología entre las familias es cercana al 40% (7) y entre subtipos la similitud aumenta hasta un 75%. Cada una de estas familias tienen un perfil de afinidad por ciertos compuestos, característico y distintivo. Todos los miembros de cada una de las familias activan al mismo sistema de transducción, cada subtipo además, es producto de un gene separado y tiene una distribución tisular específica. (8)

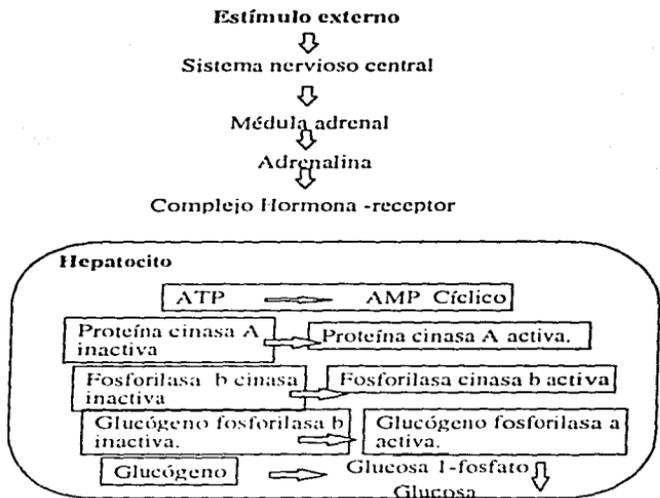


Fig. 1 Esquema de activación de la glucogenólisis generada por la hormona adrenalina en los hepatocitos. La activación de una sola molécula de receptor promueve la activación en cascada de distintas enzimas, amplificando la señal.

Estos receptores, son glucoproteínas de membrana que forman parte de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, por lo tanto, son capaces de activar o inactivar indirectamente (vía proteínas G) enzimas que se encuentran unidas a las membrana plasmática o a canales iónicos (4-5).

De la familia α_1 , se han caracterizado los subtipos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , de la familia α_2 : α_{2A} , α_{2B} y α_{2C} y tres subtipos de receptores β : β_1 , β_2 y β_3 .

La familia de receptores acoplados a las proteínas G 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 está integrada por los receptores adrenérgicos, los colinérgicos, los muscarínicos, los receptores a rodopsina y para la serotonina, la histamina, la adenosina, la angiotensina y la vasopresina entre otros.

El prototipo de receptor para esta familia de proteínas integrales de membrana es el receptor β_2 adrenérgico. (Fig. 2)

Las proteínas G que participan en la transducción de señales unen nucleótidos de guanina con alta especificidad y poseen actividad de GTPasa (4) , con lo que modulan sus interacciones con otras proteínas. Estas proteínas son heterotrímeros formados por las subunidades α , β y γ (12) cada una codificada por un gene diferente. La subunidad α contiene el sitio de unión GTP-GDP y se halla unido al complejo $\beta\gamma$ de manera no covalente. Este complejo también ancla a la membrana plasmática a G α , al menos parcialmente por una cadena lipídica isoprenoide que está covalentemente unida a la subunidad γ . De esta manera funcionan modulando la afinidad del agonista por su receptor, acoplando esta interacción con los sistemas efectores.

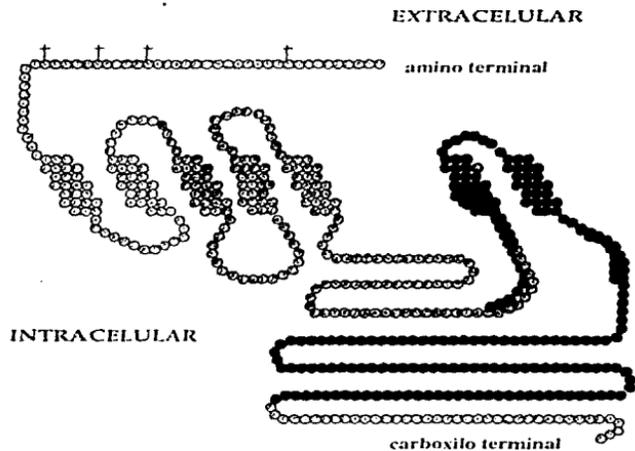


Fig. 2 Esquema del receptor β_2 adrenérgico. Consta de una sola cadena polipeptídica de siete dominios transmembranales, unidos por tres asas intracelulares y tres extracelulares. Tiene sitios de glucosilación en la región amino terminal.

En el estado basal las proteínas G existen como heterotrímeros con GDP unido a la subunidad α , 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 la proteína G, para promover un cambio conformacional con dos consecuencias: la primera, la proteína G se disocia del complejo hormona-receptor, reduciendo la afinidad de la hormona por éste, el cual regresa a su estado libre para otra nueva activación y la segunda; el GTP unido reduce la afinidad de $G\alpha$ por $G\beta\gamma$ y ocurre la disociación de subunidades que componen a la proteína G, quedando libre $G\alpha$ -GTP para realizar su papel como regulador de efectores.

En algunos sistemas el complejo $G\beta\gamma$ libre también interactúa directamente con algunos efectores (como algunas isoformas de la PLC (fosfolipasa c) y modula la actividad del complejo activo. A este complejo se le ha dado un papel importante en el proceso de desensibilización del receptor activado ya que participan en el proceso de translocación de cinasas específicas para los receptores acoplados a proteínas G (GRKs), que promueven la desensibilización vía fosforilación del receptor, lo que resulta en un bloqueo de la señal por desacoplamiento del receptor a la proteína G.

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 del GTP a GDP en el sitio de unión, causa la disociación y desactivación del complejo activo de manera que $G\alpha$ -GDP presenta mayor afinidad por $G\beta\gamma$, produciendo la reasociación posterior de $G\alpha$ -GDP con $G\beta\gamma$, con lo que el sistema regresa a su estado basal. (5)

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 catalizan la transferencia de una molécula de ADP-ribosa del NAD^+ intracelular a la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G, produciendo una alteración a esta subunidad de tal forma que la imposibilita para hidrolizar más GTP. En el caso específico de la toxina del cólera, una vez ADP-ribosilada la subunidad $G\alpha_s$, produce una elevación de los niveles del AMP

efélico porque promueve la activación de la enzima adenilato ciclasa en las células epiteliales del intestino evitando la resorción de iones sodio y agua, esto produce la diarrea, síntoma característico de la enfermedad del cólera.

A la fecha se ha descubierto que existen varios tipos de proteínas G, hay por lo menos dos formas de Gs (denominada Gs porque esta involucrada en la estimulación de la adenilato ciclasa), tres formas de Gi (llamada así porque inhibe a la adenilato ciclasa) y la familia de Gq que activan a la PLC. Aunque no se conoce la función de todas ellas, se sabe que un receptor puede interactuar con más de una proteína G y que ésta a su vez puede modificar la actividad de más de un efector membranar. Los dos sistemas de transducción mejor conocidos acoplados a proteínas G son: el sistema de **adenilato ciclasa** y el de **recambio de fosfoinosítidos-calcio**.

Las proteínas G, son entonces ejemplos de moléculas que permiten el acoplamiento entre el receptor y las moléculas efectoras, que en el caso específico del sistema de transducción de recambio de fosfoinosítidos- calcio, son moléculas membranales, como la fosfolipasa A₂, la fosfolipasa C. La activación de estas moléculas por las proteínas G conlleva a la generación de sustancias conocidas como segundos mensajeros, los cuales son los responsables de las modificaciones metabólicas generadas en la célula, después de recibir el mensaje. (Fig. 3)

Es al sistema de transducción antes mencionado, al que están acoplados los receptores α_1 adrenérgicos, objeto principal de estudio del presente trabajo.

Por análisis de hidropatía se ha llegado a establecer que en la región transmembranar de los receptores adrenérgicos existen entre 20 y 25 aminoácidos que constituyen cada uno de los dominios hidrofóbicos, que estos además, se encuentran separados por residuos hidrofílicos. Los siete dominios hidrofóbicos son los más conservados entre los distintos subtipos de receptores, mientras que las regiones amino y carboxilo, así como la tercera asa intracelular, son las regiones más variables (10).

Receptor estimulado
por agonista

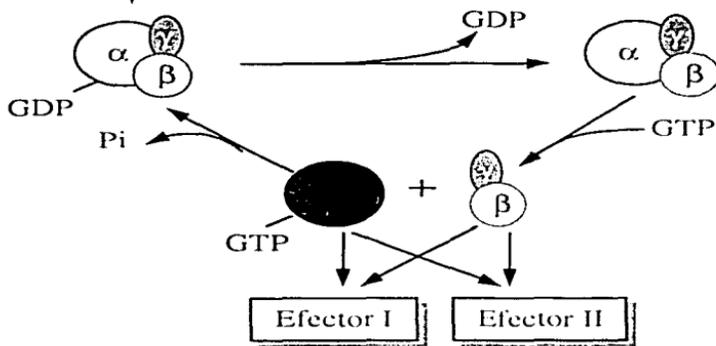


Fig. 3 Esquema de activación de las proteínas G. El complejo ligando receptor activa a la proteína G. Se lleva a cabo el recambio de GDP por GTP, lo cual, induce la disociación de ésta en las subunidades $G\alpha$ -GTP y el complejo $G\beta\gamma$.

Tabla No.1 Clasificación farmacológica de los receptores adrenérgicos

Subtipo	Antagonistas selectivos	Localización tisular
α_{1A}	5-metilurapidil, (+)-Niguldipina	Corazón, hígado, cerebelo, corteza cerebral, próstata, pulmón y vasos deferentes.
α_{1D}	BMY 7378, SKF105854	Aorta de rata, pulmón y corteza cerebral
α_{1B}	---	Riñón, bazo, aorta y pulmón.
α_{2A}	----	Plaquetas, corteza cerebral, médula espinal.
α_{2B}	ARC 239	Hígado y riñón
α_{2C}	ARC 239 (con potencia menor al anterior)	Corteza cerebral
β_1	Metoprolol, CGP 20712A	Corazón
β_2	ICI 118551	Músculo liso gastrointestinal, genitourinario y bronquial.
β_3	ICI 118551 y CGP 20712A	Tejido adiposo

3.1 Los receptores β adrenérgicos.

Los receptores beta adrenérgicos están acoplados al sistema de activación de la adenilato ciclasa. Este sistema tiene como proteína efectora a esta enzima, capaz de producir AMP cíclico a partir de ATP, con la liberación de pirofosfato. El sistema está acoplado a la subfamilia de proteínas G, la Gs, que estimula a la adenilato ciclasa. El AMP cíclico

generado es un modulador de la actividad de la proteína cinasa A (proteína cinasa dependiente de AMP cíclico), que es un tetrámero asimétrico constituida por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. La unión de AMP cíclico a las subunidades reguladoras altera su afinidad por las subunidades catalíticas, provocando su disociación en un dímero de subunidades reguladoras-AMP cíclico y dos subunidades catalíticas en forma de monómero. La subunidad catalítica, promueve la fosforilación de varias proteínas (13), como la fosforilasa b cinasa, que participa en la glucogenólisis. (14)

Todos los tipos de receptores beta adrenérgicos pueden ser activados por adrenalina y por la noradrenalina, sin embargo, a diferencia de los receptores alfa (α_1 y α_2), las catecolaminas endógenas tienen diferentes afinidades para los subtipos beta adrenérgicos (adrenalina > noradrenalina).

El receptor β_1 es igualmente sensible a ambas catecolaminas, mientras que el receptor β_2 es cien veces menos sensible. Ambos receptores son altamente sensibles al antagonista propanolol, mientras que el receptor β_1 , por su parte, es menos sensible.

Los receptores β_1 adrenérgicos son los encargados de mediar las principales respuestas a la adrenalina en el músculo cardíaco, mediante la unión de la hormona a estos receptores se produce un aumento en la frecuencia y en la fuerza de contracción cardíaca así como un aumento en la velocidad de conducción. Los receptores del subtipo β_2 median la relajación en musculatura lisa, sobre todo a nivel gastrointestinal y bronquial. Los receptores β_3 median la respuesta de tejido adiposo a adrenalina promoviendo la lipólisis.

3.2 Los receptores α_2 adrenérgicos.

Estos receptores no presentan diferencias notables en la afinidad por los agonistas endógenos (adrenalina y noradrenalina). Sin embargo, se bloquean de manera diferencial por distintos antagonistas. Los receptores α_{2A} son los menos sensibles a la prazosina, aunque su afinidad es 5000 veces mayor para los α_1 que para los α_2 .

Esta familia de receptores están acoplados al sistema de adenilato ciclasa, pero de manera inhibitoria. La diferencia con los receptores beta, es que los receptores α_2 se acoplan a la subpoblación de proteínas Gi, que al interactuar con esta enzima, la inhiben.

Estos receptores se encuentran en las células β presentes en los islotes del páncreas, en donde disminuyen la secreción de insulina, se encuentran además, en las plaquetas disminuyendo su agregación y en terminaciones nerviosas donde controlan la liberación del neurotransmisor norepinefrina.

En la musculatura vascular promueven relajación, disminuyendo la resistencia periférica. (Fig.4)

3.3 Los receptores α_1 .

Esta familia esta compuesta por un grupo heterogéneo de receptores, que llevan a cabo una amplia gama de funciones fisiológicas y metabólicas, entre las que destacan la regulación de la contracción del músculo liso, la gluconeogénesis y glucogenólisis en el tejido hepático, entre otros procesos.(15).

Existen evidencias farmacológicas y de caracterización molecular de por lo menos tres subtipos de receptores α_1 : α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} (16). Los receptores α_{1A} adrenérgicos presentan alta afinidad por los agonistas metoxamina y oximetazolina y por los antagonistas WB 4104, fentolamina, 5-metilurapidil y (+)-niguldipina. Se encuentran localizados de manera homogénea en corazón, hígado, cerebelo, próstata, pulmón y vasos deferentes. Los receptores α_{1B} tienen una afinidad más baja por los agentes antes mencionados y se encuentran localizados en riñón, bazo, aorta y pulmones. Por técnicas de clonación molecular y farmacología se ha descrito el tercer subtipo α_1 , el α_{1D} . Este último se diferencia del α_{1A} , porque tiene una menor afinidad por (+)-niguldipina y metoxamina. Se

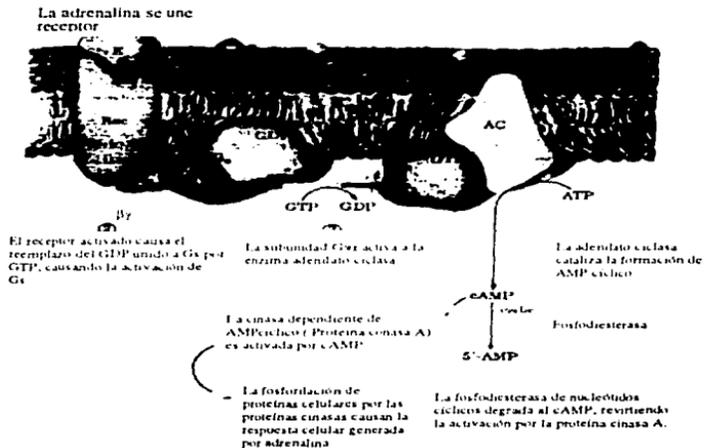


Fig. 4 Sistema de la Adenilato Ciclasa. Los receptores α_2 adrenérgicos acoplados a la proteína G_i promueven la inhibición de esta vía, por inactivación de la enzima adenilato ciclasa, principal proteína efectora de la misma. Los receptores β en cambio; acoplados a G_s , producen el efecto inverso. Ilustración: *Lehninger A., Nelson D.; Cox M., "Principles of Biochemistry"*. Segunda edición.

encuentra distribuido en la corteza cerebral, hipocampo y en menor proporción en aorta y próstata.

Una vez que hay activación del receptor por su unión al ligando, éste interactúa con la subpoblación de las proteínas G, la familia de proteínas Gq. Es la subunidad Gq α la que interactúa directamente con la fosfolipasa C (PLC), cuyo sustrato específico es el fosfatidil-inositol (4,5) bifosfato, que representa menos del 1% de los lípidos de la membrana. La acción de la PLC promueve la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol (1,4,5)trifosfato (IP₃). El DAG actúa a la proteína cinasa C que inicia una cascada de fosforilaciones, por otra parte el IP₃ promueve la liberación de calcio de reservorios intracelulares por acción sobre receptores específicos sobre retículo endoplásmico. El DAG producido por degradación del fosfatidil -inositol (4,5) bifosfato es además rápidamente metabolizado, pudiendo servir como fuente para la generación de ácido araquidónico, que por sí mismo actúa como mensajero o sirve como fuente para la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos.

Se ha observado que la elevación de la concentración de calcio intracelular, después de la estimulación de los receptores acoplados a este sistema, proviene de dos fuentes: la primera es la liberación de calcio de las pozas internas y la segunda, es la entrada de calcio del medio extracelular.

El calcio es un segundo mensajero que activa a una serie de proteínas dependientes de calcio, entre éstas tenemos algunas isoformas de la PKC y a la cinasa de la fosforilasa a, entre otras. El DAG por su parte parece permanecer en la membrana plasmática, donde interactúa directamente con la PKC produciendo un aumento en su afinidad por el calcio, lo que trae como consecuencia su activación.

Al referirnos a la PKC, hablamos de una familia muy amplia y diversa de isoformas de esta proteína. Se conocen al menos 12 isoformas que han sido clasificadas en tres familias. Las cPKC convencionales dependientes de calcio (α , β I , β II , γ) , las nPKC

(δ, ϵ, τ), insensibles a calcio, que son reguladas por fosfolípidos, diacilglicerol y ésteres de forbol. Por último las aPKC (denominadas atípicas; isoformas ζ, λ, τ) insensibles a diacilglicerol, ésteres de forbol y calcio.

Esta proteína, además, tiene la capacidad de modular la función de elementos participantes en los sistemas de transducción existentes, como los receptores, proteínas G y efectores membranales como la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C y algunos canales iónicos, en los cuales inhibe o potencia su actividad. (Fig. 5)

Todos los mecanismos descritos anteriormente contemplan sólo la activación de las diferentes vías de transducción que permiten la generación de la respuesta tisular a la hormona adrenalina, sin embargo y quizás igual de importante que el proceso de activación sean los procesos "moduladores" de estas respuestas.

Muchos receptores acoplados a proteínas G, regulan la acción de sus agonistas cuando éstos se presentan de manera persistente o repetida. Cuando esto ocurre, la respuesta al estímulo hormonal se ve disminuida e incluso ausente; este fenómeno es conocido como **desensibilización**.

La ocupación del receptor por su agonista además de desencadenar la cascada de eventos para la generación de la respuesta fisiológica, dispara también una serie de eventos que modulan la eficiencia del proceso de transducción; éstos incluyen fosforilación de receptores, compartimentalización de los mismos y cambio en el número de receptores o al menos de aquellos que están disponibles en la membrana plasmática.

4.- Organización genómica y regulación de los niveles en la expresión de los mensajeros de los receptores α ,

A diferencia de otros genes de muchos receptores acoplados a G, incluyendo a los beta adrenérgicos, y los tres subtipos de la familia α_2 que contienen varios intrones, los genes

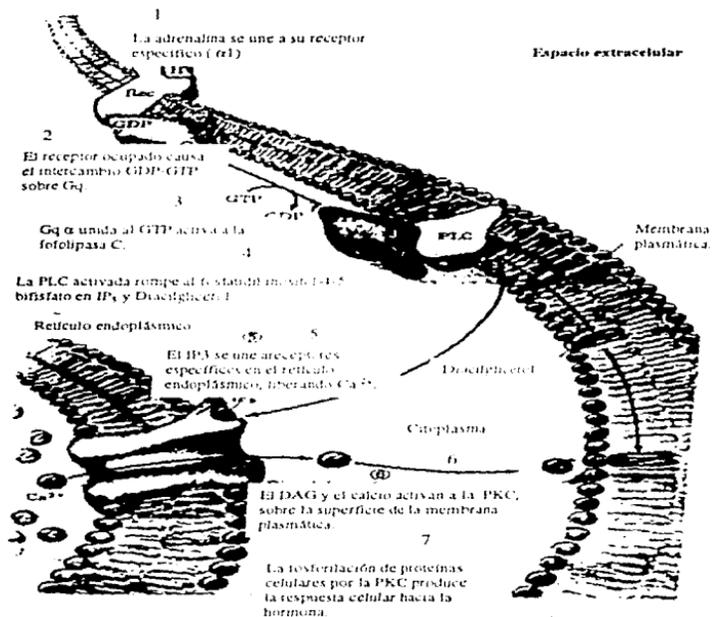


Fig. 5 Sistema de Recambio de Fosoinositidos- Calcio. El Diacilglicerol y el Ca^{2+} activan a la proteína cinasa C que se encuentra en la membrana plasmática. La fosforilación de distintas proteínas intracelulares por esta cinasa, produce la respuesta celular generada por la adrenalina. Ilustración: Lehninger A., Nelson D., Cox M., "Principles of Biochemistry". Segunda edición.

que codifican para los receptores α_1 , sólo contienen un intrón. Los genes para cada uno de los subtipos de receptores α_1 consisten en dos exones y un intrón muy largo (14 a 20Kb), que interrumpe la región codificante al final del sexto dominio transmembranal. En todos los casos, las vecindades intrón/exón están situadas después de la primera base del codón, indicando sitios para procesamiento.

Por análisis tipo Southern blot se ha podido identificar que el gene que codifica para el subtipo α_{1B} se encuentra en una sola copia en el genoma humano (17- 18)

Las regiones 5' y 3' no traducidas sólo se han evaluado con detalle para el subtipo α_{1B} . La región 5' no traducida (924 pb) del gene α_{1B} del humano es rica en su contenido de G+C (70%), algunas de estas regiones (cajas GC) se han caracterizado como sitios consenso para respuesta a AMP cíclico(19). Se han encontrado también regiones para señales de poliadenilación, una de ellas inicia 263 pb abajo del codón de término. Por lo tanto se ha descrito que el RNA mensajero maduro tiene de longitud 2.2 kb.

Diversos estudios han indicado que la transcripción del gene que codifica para el receptor α_{1B} está muy regulada y ocurre de manera opuesta en muchos tejidos y líneas celulares, así como durante el desarrollo y la diferenciación celular.

La regulación de la expresión para este subtipo de receptor ha sido muy estudiada en el hígado de la rata, en donde los efectos de la hormona adrenalina se llevan a cabo mediante la acción de receptores α_1 , así como a la acción de receptores β_2 . En este sistema se ha podido caracterizar la respuesta adrenérgica en una variedad de condiciones fisiológicas, como el envejecimiento en ratas (23) y patológicas en donde se ha demostrado que éstas se regulan de manera recíproca. Estos estudios indican que en el órgano intacto de un animal adulto, la activación de la glucogenólisis hepática está mediada por los receptores α_{1B} . Sin embargo, en células en proceso de diferenciación, esta respuesta está mediada preferentemente por los receptores β_2 . (20-21)

Algunas alteraciones como la dispersión de los hepatocitos en cultivos primarios, hepatectomía parcial, colestasis y transformación maligna, son algunos ejemplos de procesos que producen que los hepatocitos entren en etapa de diferenciación, y es en algunos de estos procesos, en donde se ha comprobado se lleva a cabo la transición de tipos de receptores adrenérgicos principalmente de α_1 a β_1 . (21, 24-25)

Es en el marco anterior y tomando en cuenta la importancia fisiológica y potencial terapéutico que tiene el estudiar los mecanismos moleculares que intervienen en la generación de la respuesta adrenérgica en el hígado, que nuestro laboratorio se ha dedicado a estudiar los eventos involucrados en la respuesta α_1 .

Antecedentes

Con la comprobación de la existencia de subtipos de receptores y su heterogeneidad en la expresión tisular entre especies (32), se demuestra que el mecanismo mediante el cual se genera una respuesta celular es complejo; demuestra también que todos estos mecanismos le permiten a la célula responder a los diferentes estímulos y le confieren la capacidad de modular estas respuestas, lo que en conjunto facilita sus posibilidades de adaptación.

Ejemplo de lo anterior es la heterogeneidad que presenta la familia de los receptores α , adrenérgicos. Hace aproximadamente 15 años datos inicialmente basados en estudios funcionales, farmacológicos y bioquímicos permitieron la acumulación de datos que sugerían la existencia de heterogeneidad en esta familia de receptores.

En 1982, McGrath (22) y Ruffolo propusieron ya la existencia de al menos dos subtipos de receptores adrenérgicos, en función a las distintas afinidades que éstos presentaban por distintos compuestos. En 1983 Holk *et al* demostraron las diferentes interacciones de la clonidina y la metoxamina con los receptores α , en arterias pulmonares de conejo sugiriendo la existencia de múltiples subtipos de receptores.

En 1984 Medgett y Langer demostraron que en arterias caudales de rata existían dos poblaciones de receptores α , adrenérgicos, una con baja afinidad y otra con alta afinidad a la prazosina.

Pero no fue sino hasta el año de 1986 cuando se contaba ya con una gran batería de agonistas y antagonistas específicos para la identificación de estos receptores, cuando los investigadores Morrow y Cresse (26) obtuvieron clara evidencia de la existencia de al menos dos subtipos de receptores α . Ellos estudiaron mediante ensayos de "binding", en membranas de cerebro de rata, que muchos de los ligandos empleados exhibían curvas de desplazamiento bifásico indicando sitios de alta y baja afinidad por los diferentes compuestos. Así los sitios de alta afinidad por fenilefrina, epinefrina, norepinefrina, y

fentolamina fueron denominados como receptores del subtipo α_{1A} y los de baja afinidad como α_{1B} .

Por otra parte, Johnson y Minneman en 1987 demostraron que el agente alquilante, análogo a la clonidina, la cloretilelonidina (CEC), reduce, aunque no completamente la actividad de esta familia de receptores. Tomando en cuenta que la fenoxibenzamina y otros agentes alquilantes eran capaces de eliminar totalmente la actividad de los receptores α_1 , concluyeron entonces que existían dos poblaciones de receptores α_1 , uno sensible (subtipo α_{1B}) y otro insensible (subtipo α_{1A}) a CEC.

Todas las clasificaciones anteriores estaban basadas exclusivamente en las afinidades mostradas por cada uno de los diferentes subtipos por diversos compuestos, tanto agonistas como antagonistas. Esta clasificación, sin embargo, se complicó por el uso de las técnicas de biología molecular que permitieron la clonación de los cDNA's(DNA complementario) de los tres subtipos distintos de adenosreceptores de la familia α_1 , debido a que dos de estos receptores recombinantes no presentaban el perfil farmacológico esperado para los subtipos nativos, una vez que eran transfectados en líneas celulares modelo.

El primer subtipo de receptor de esta familia fue clonado de una biblioteca de cDNA de hamster en 1988 (27). La estrategia de clonación consistió en la purificación por cromatografía en columna de afinidad para glucoproteínas, del receptor α_1 presente en la línea celular DDT1-MF-2 (línea tumoral obtenida de miosarcoma de hamster) que expresa los receptores adrenérgicos α_1 y β_2 . Por predicción de la secuencia de nucleótidos a partir de la secuencia parcial de aminoácidos de un péptido obtenido por hidrólisis del receptor purificado con bromuro de cianógeno, se sintetizó un oligonucleótido de 42 pares de bases de longitud, que se empleó como sonda en una biblioteca de expresión (cDNA) de la misma línea celular. Se obtuvo un cDNA de 1.7 Kb de longitud. La transfección de este cDNA en la línea celular Cos-7 comprobó que este receptor

recombinante era capaz de activar la vía de recambio de fosfoinosítidos y mostraba además un perfil farmacológico correspondiente al receptor α_{1A} nativo.

La clonación de los demás subtipos, se llevó a cabo mediante la búsqueda en distintas bibliotecas genómicas empleando como sonda la obtenida anteriormente, variando condiciones de hibridación. Esto pudo llevarse a cabo gracias a que la similitud en secuencia entre los subtipos oscila entre el 75 y el 80%.

El siguiente subtipo de receptor α_1 clonado fue obtenido una biblioteca genómica de cerebro de bovino, y el correspondiente receptor recombinante transfectado tenía afinidades por agonistas y antagonistas que eran consistentes con lo esperado para el subtipo de receptor α_{1A} nativo, sin embargo, el receptor recombinante fue parcialmente sensible al agente alquilante CEC, además de que la expresión tisular del RNA mensajero para este subtipo no concordaba con la esperada en los tejidos modelo de rata. Debido a lo anterior la clona fue considerada como un subtipo nuevo de receptor de esta familia y se le designó como el subtipo α_{1C} . (28)

Un tercer subtipo de adrenoreceptor α_1 fue clonado de la corteza cerebral de rata y se designó como como el subtipo α_{1B} , basada esta clasificación en que la expresión del RNA mensajero en los tejidos de rata eran parecidos a los esperados, además de ser muy poco sensible a la alquilación irreversible por CEC. Sin embargo, otro grupo clonó de manera independiente en 1991, un receptor idéntico, y se mostró que éste tenía afinidades para muchos antagonistas selectivos que no correspondían a los esperados para el subtipo nativo. Debido a que ya había una clona identificada como α_{1C} a ésta se le designó como α_{1E} . (29)

Recientemente, se han hecho muchos reportes en donde se muestra que la farmacología del receptor recombinante identificado como α_{1E} , es casi idéntica a la encontrada para el subtipo α_{1A} nativo, con excepción de la sensibilidad al agente alquilante CEC. (30)

Así también, mediante técnicas de "Northern blot" y ensayo de protección a RNAsas empleando sondas específicas para cada uno de los distintos subtipos clonados, se ha demostrado la presencia del subtipo identificado como α_{1c} , en cada tejido de rata en donde se había identificado farmacológicamente el subtipo α_{1A} .

La diferente sensibilidad a CEC de los distintos subtipos de receptores recombinantes se ha explicado como el resultado de las diferencias que existen entre las características de las membranas plasmáticas de las células en donde han sido transfectados.

Para hacer más homogéneas las condiciones en las cuales eran expresados los receptores recombinantes, todos los subtipos de receptores α_1 clonados fueron expresados en la misma línea celular (62) y al hacer los ensayos de inactivación por CEC, se demostró que la clona designada como α_{1c} sufría inactivación entre un 20 y un 25% en comparación a las clonas α_{1A} y α_{1D} que se inactivaban entre un 75 y 90%. Debido a los resultados anteriores a la clona designada como α_{1c} , se le consideró insensible a CEC y hoy esta clona es identificada como el subtipo α_{1e} , que corresponde al receptor α_{1A} nativo.

Actualmente la IUPHAR (International Union of Pharmacology) admite la existencia de 3 subtipos de receptores recombinantes designados α_{1c} , α_{1A} y α_{1D} cuya farmacología y distribución tisular, corresponden a los subtipos nativos α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} respectivamente. De aquí en adelante la letra como subíndice para designar a los subtipos serán minúsculas o mayúsculas para diferenciar entre los receptores recombinantes y nativos respectivamente.(31)

Tabla. 2 Clasificación actual de los subtipos de receptores α_1 adrenérgicos.

Receptor nativo	Receptor clonado. Nomenclatura actual	Nomenclatura histórica	Localización cromosómica en el humano	Sensibilidad a CEC.
α_{1A}	α_{1c}	α_{1c}	C8	Especie dependiente (32)
α_{1B}	α_{1a}	α_{1a}	C5	+++Muy sensible
α_{1D}	α_{1d}	α_{1a} , α_{1d} , α_{1b}	C20 p13	Medianamente sensible.

En el laboratorio en donde se realizó el presente trabajo de tesis, García-Sáinz y colaboradores, en el año de 1992 mostraron por primera vez, la heterogeneidad en la expresión hepática de los adrenoreceptores α_1 entre especies. Ésta se mostró tanto farmacológicamente como por ensayos de tipo "Northern blot" como prueba de expresión de estos subtipos en los hepatocitos de rata, cuyo y conejo. En estos ensayos se empleó además como criterio de clasificación farmacológico la inactivación por alquilación con CEC.(32)

Así, al receptor presente en la membrana de los hepatocitos de cuyo, que resultó ser muy poco sensible a la inactivación por CEC fué clasificado como α_{1c} , el de hepatocitos de conejo, medianamente sensible a este agente, se le clasificó como α_{1d} . El de rata como especie prototipo de expresión hepática del subtipo α_{1B} , fue sumamente sensible a la inactivación a la CEC. En estos ensayos se verificaba la capacidad de hidrolizar

fosfatidilinositol por hepatocitos aislados de estas especies, pretratados con el agente CEC a una concentración de 0.1mmol/L. (Fig. 6)

Tabla No. 3 Características de los receptores α_1 clonados.

Subtipo	α_{1a}	α_{1b}	α_{1d}
Número de aminoácidos	466	515	561
Sitios de glucosilación (Amino-terminal)	3	4	2
Organización genómica	1	1	1
Intrones	2	2	2
Exones			
Selectividad farmacológica.	5-Metilurapidil, (+) niguldipina, oximetazolina, A-61603,RS17053	AH1110A	(+) Norepinefrina, BMY 7378
Tejidos prototipo	Riñón de rata, hígado de conejo, corazón e hígado de humano.	Bazo, hígado y corazón de rata.	Aorta, pulmón y corteza cerebral de rata.

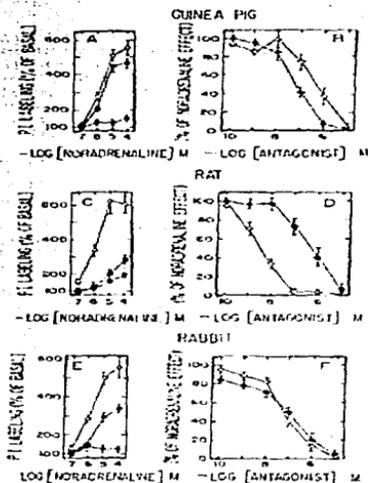


Fig. 6. Efecto de la cloroetilclonidina sobre el marcaje de PI (fosfatidilinositol) inducido por adrenalina en hepatocitos de tres especies distintas (cuyo conejo p neles A, C y E. Las células fueron preincubadas en ausencia de agentes (cfruclos claros), con 0,1 mmol/L de cloroetilclonidina (cuadrados negros) o 1 $\mu\text{mol/L}$ de prazobind (cfruclos oscuros) durante 15 minutos. En esta figura puede apreciarse el efecto producido por CEC sobre los diferentes subtipos de receptores presentes en las membranas de los hepatocitos de estas especies. Efecto de antagonistas α_1 -adrenérgicos sobre el marcaje de PI. P neles B, D y F. Prazosina (rombos vacíos) y 5-metilurapidil (rombos llenos). Estos datos fueron obtenidos en nuestro laboratorio en el año de 1992. (32)

interpretar, en el caso del *cuyo*. La clasificación farmacológica del subtipo α_1 adrenérgico presente en los hepatocitos de esta especie fue hecha también en nuestro laboratorio, en donde se comprueba por ensayos de "binding" que el receptor que expresa el *cuyo* corresponde al subtipo α_{1A} . (33)

Por lo tanto, actualmente existe inconsistencia entre los datos obtenidos por "Northern blot" y los datos reportados por "binding", debido a que hubo hibridación con la sonda para el subtipo α_{1A} y no se encontró señal de hibridación con la sonda específica para el subtipo α_{1B} , que es el subtipo presente reportado en esta especie.

Esencialmente esta controversia, es la que condujo a la necesidad de clonar el receptor presente en los hepatocitos de *cuyo*.

Con esta clonación se pretende explicar, por una parte, el por qué de la hibridación con la sonda específica para el subtipo α_{1A} en los ensayos tipo "Northern", además de aportar más información sobre la estructura y organización genómica de esta familia de receptores.

En este trabajo, la caracterización molecular del receptor α_1 presente en los hepatocitos de *cuyo* se llevó a cabo mediante la amplificación por RT-PCR de una región de 316 pb (pares de bases) empleando oligonucleótidos específicos ya reportados en la literatura para el subtipo α_{1A} (subtipo ya caracterizado en esta especie por "binding").

Para la clonación del cDNA que codifica para el subtipo de receptor adrenérgico presente en el hígado de *cuyo*, se empleó la técnica de RT-PCR para lograr la amplificación de un fragmento correspondiente a la región codificante completa de este gene, utilizando oligonucleótidos específicos.

OBJETIVOS

General:

- Clonar el cDNA que codifica para el subtipo de receptor α , adrenérgico que se expresa en los hepatocitos de cuyo.

Específicos:

- Establecer condiciones experimentales de reverso transcripción para la obtención del cDNA que codifica para el subtipo de receptor α , adrenérgico presente en el hígado del cuyo.
- Determinar condiciones experimentales para la amplificación por PCR de una región central perteneciente a este receptor mediante el empleo de oligonucleótidos específicos .
- Diseñar oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región codificante completa de este receptor.
- Establecer condiciones experimentales para la amplificación por RT-PCR de la región anterior.
- Caracterizar los fragmentos generados por PCR mediante datos moleculares (hibridación y secuenciación).
- Subclonar estos fragmentos en vectores plasmídicos.

MATERIALES Y METODOS

Oligonucleótidos empleados para los diferentes ensayos de RT-PCR.

OLIGONUCLEOTIDO	ORIENTACION	Referencia	Tm
5'-catcgtggtggctgctgctgctgctgctg-3'	Sense α_{1A}	-44	60°C
5'-tcccacggggatgagacacatgacctgtg-3'	Antisense α_{1A}	-44	61°C
5'-atgggtttctctcgggaaatgctctcga-3'	Sense α_{1A}		65°C
5'-tagactgtgtcccatttcactgaggga-3'	Antisense α_{1A} extremo 5' (ATG)	Esta tesis	
	extremo 3' (GSP2)	Esta tesis	62°C
5'-gtctgtgtgggacacgtacacccggagta-3'	Antisense α_{1D}	Esta tesis	62°C
5'-caaccgccactacagagpplcaactta-3'	Sense α_{1D}	Esta tesis	60°C
5'-agatccacaacggatacatt-3'	Antisense GAPDH	-45	49°C
5'-tccctcaagattgacgcaa-3'	Sense GAPDH	-45	50°C
5'-atcctgaagttgacgtggac-3'	Sense β -Actina	-46	52°C
5'-aacgcactgtgtgcaactta-3'	Antisense β -Actina	-46	53°C

Sondas para hibridación:

α_{1c} de bovino : Fragmento Bgl II- Bgl II de 812 pb.

α_{1a} de hamster : Fragmento EcoRI-BamHI de 803 pb.

α_{1d} de rata : Fragmento Bam HI de 850 pb subclonado en el vector pMT2'.

Sonda Vs. GAPDH de rata: Fragmento Sau 3A de 599 pb subclonado en el vector pRGAPDH13.

Animales

Se emplearon cuyos machos con un peso entre 200 y 500 g., alimentados *ad libitum*.

Equipo

Termociclador ERICOMP Single Block™ System.

Microcentrifuga para tubos eppendorf

Centrifuga BECKMAN RC5B

Espectrofotómetro BECKMAN DU® 650

Incubadoras con agitación

Contador de centelleo BECKMAN LS6000SC

Baños recirculadores a varias temperaturas (16°C, 37°C, 55°C y 65°C)

Cámaras de electroforesis Hoefer horizontal y vertical (Minigeles)

Cámara para electroforesis BioRad

Cámara para geles de secuencia BRL

Fuentes de poder para electroforesis

Transiluminador de luz U.V.

Lámpara de U.V

Entrecruzador U.V. FOTODYNE

Unidades de filtración

Autoclave

Incubadora a 37°C

Vórtex

Ultraturrax

Perfusores

Material

Tubos eppendorf 1.5 y 0.500 ml
Matraces Erlenmeyer 125-500ml
Vasos de precipitados
Tubos COREX* para centrifuga
Tubos de ensaye estériles para precultivos
Membrana de Nylon para transferencia Amersham*
Criotubos
Microjeringas 10-100 µl
Micropipetas GLISON*
Puntas para pipeta estériles y con filtro (PCR).
Mechero

Reactivos

Todos los reactivos empleados son de alta pureza (Grado Biología Molecular SIGMA)

Kit RT-PCR Perkin Elmer (100 reacciones)

Aceite mineral (PCR) SIGMA

Agarosa Standar Low BioRad

Todos los reactivos sólidos fueron provistos por la casa comercial BAKER* y SIGMA*

Sigmacote (silicón) SIGMA

TEMED GIBCO

Kit para secuencia USB Sequenase Ver.2.0

Kit 5' RACE (Rapid Amplification cDNA's ends) GIBCO BRL

Kit 3' RACE GIBCO BRL

Kit Glass MAX * DNA isolation Spin Cartridge System GIBCO BRL (Purificación de productos de PCR).

Kit Nick Translation (marcaje de sonda) AMERSHAM

Ligasa T4 *Biolabs* 4U / μ l

Polimerasa de T4 *Biolabs* 4U/ μ l

Todas las enzimas de restricción y marcadores de peso molecular provienen de la casa comercial *Biolabs*.

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido SIGMA

IPTG Isopropiluo- β -D-galactósido SIGMA

Medio LB (Luria Bertani)

Vectores plasmídicos

Ampicilina

Kanamicina

Métodos

Obtención de RNA de tejido completo. Esta técnica consiste en disgregar el tejido con tiocianato de guanidina 5 mol/L. (34-36).

Obtención de RNA de hepatocitos aislados.

Se empleó como tejido modelo, el hepático debido a la gran relevancia del papel fisiológico que este órgano lleva a cabo. Además la respuesta adrenérgica que presenta este tejido en animales adultos está mediada principalmente por los receptores α_1 .

Obtención de hepatocitos

Los hepatocitos se aislaron por el método de digestión con colagenasa de Berry y Friend (37), 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 carbónico (95% O₂/ 5% CO₂) a pH 7.4; una vez perfundido, el hígado se digirió

perfundiendo con colagenasa en KRB con calcio 1.2 mmol/Lol/L. Después se separaron las células y se formó una suspensión , lavándose ésta tres veces con KRB con calcio.

Extracción de RNA

Se resuspendieron 2 g de células recién aisladas en 30 ml del reactivo TRI-Reagent (38) y se agitaron vigorosamente en el vortex. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente se adicionaron 6 ml de una mezcla cloroformo-isoamilico (49:1), y la mezcla se agitó durante 20 segundos en el vortex. La mezcla anterior se centrifugó a 27 000 x g durante 15 minutos. Se tomó la fase aciosa con una pipeta pasteur estéril, se midió el volumen y se le adicionó un volumen igual de isopropanol frío. Las muestras se dejaron en hielo durante 30 minutos. Después de este tiempo se centrifugaron a 27 000 x g durante 15 minutos. El "peller" resultante se lavó 2 veces con etanol al 70% frío. Las muestras se secaron al vacío y se resuspendieron en 100 µl de agua tratada con DEPC. El RNA se cuantificó por espectrofotometría 260/280 y se verificó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio.

Ensayos de RT-PCR

Se empleó el " kit para RT-PCR" de la marca PERKIN-ELMER.

Reacción de transcripción inversa. RT (Obtención de cDNA)

En un tubo eppendorf de 500 µl, se colocaron a reaccionar 5 µg de RNA total con amortiguador de MgCl₂ a una concentración final de 5 mmol/L, amortiguador 10X para PCR II (1X concentración final), 8 µl de una mezcla de nucleótidos (1mmol/L final c/u) y 1 µl del oligonucleótido antisense (oligo down; 15 µ mol/L final) con 2.5 U/µl de la

enzima MuLV Reverse Transcriptase en un termociclador con un ciclo compuesto por 1 hora a 42°C y 15 minutos a 70°C.

Reacción de PCR (Amplificación del cDNA)

A la mezcla de reacción obtenida por RT, equilibrada a temperatura ambiente se le adicionó amortiguador de Mg₂Cl (2mmol/L final), 10x PCR AMORTIGUADOR II (500mmol/Lol/L KCL, 100mmol/L Tris-HCl; pH 8.3) para una concentración final 1X, agua destionizada y estéril suficiente para completar 100 µl de volumen final y 1 µl de oligonucleótido sense (oligo up, 15 mmol/L final). La mezcla anterior se puso a reaccionar con 2.5 U de la enzima *Thermus aquaticus* DNA polimerasa con el siguiente perfil de amplificación durante 35 ciclos, adicionando un tiempo de 7 minutos a 72 °C al finalizar éstos, para la extensión 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, y 2.5 min a 72°C. Las condiciones antes mencionadas se estandarizaron en nuestro laboratorio, probando distintas temperaturas y tiempos de alineamiento de los oligonucleótidos. Se analizaron 10 µl del producto de PCR por una electroforesis en gel de acrilamida al 7.5%, en amortiguador TBE 1X.

Purificación de los fragmentos de PCR

Se llevó a cabo la purificación de los fragmentos obtenidos por PCR mediante el empleo de un kit elaborado por GIBCO BRL* . GlassMax DNA Isolation Spin Cartridge.

Clonación de los fragmentos de PCR

I. Ligación

Se emplearon los vectores plasmídicos pTZ19U™ y pCR- Script™ SK+ (39 -40)

Reacción de ligación. (41)

Para la reacción de ligación se empleó 1µg del producto de PCR purificado con 1µg de vector. La reacción de ligación se llevó a cabo a 16°C toda la noche.



Fig. 8 Clonación de un segmento de DNA en un vector plasmídico. El sitio de policonexión contiene el gene para sintetizar a la subunidad alfa de la enzima β -galactosidasa (α -complementación). Si el inserto fue ligado, interrumpirá el gene de la enzima impidiéndole a la bacteria utilizar el sustrato X-gal en el medio de cultivo apareciendo con fenotipo blanco, las clonas sin inserto aparecen azules. (42)

II. Transformación de bacterias con los productos de ligación.

Se emplearon bacterias competentes con cloruro de hexaminocobalto de la cepa de *E.coli* JM103. (48)

En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron 200 µl de una suspensión de bacterias competentes con los 20 µl de la reacción de ligación.

Se dejaron incubando durante 1 hora en hielo. Después del tiempo de incubación se les dio un choque térmico a 42°C durante 90 seg y se colocaron en hielo 2 minutos. Se les adicionó 1 ml de medio LB y se les incubó durante una hora a 37°C.

Después de este tiempo se centrifugaron los cultivos a 4 000 x g durante 3 min en una microfuga.

El "pellet" resultante se resuspendió en 200 µl de medio LB y todo el volumen se extendió sobre agar LB adicionado con ampicilina, X-gal e IPTG. Las placas de agar se dejaron incubando a 37°C toda la noche.

III . Selección de clones positivas

Se llevó a cabo mediante la técnica de hibridación en colonia.

Las colonias que crecieron blancas después de la transformación se estiraron con palillos estériles sobre una membrana de Nylon colocada sobre una caja Petri con medio LB ampicilina. Las cajas se incubaron invertidas durante 14 horas a 37°C . De todas las cajas se hizo una réplica pero sin la membrana.

Las membranas se retiraron de las cajas y se lavaron 2 veces, durante 3 min cada lavado, colocando la membrana sobre un papel filtro impregnado con las siguientes soluciones:

1.- Solución de NaOH 0.5 mol/L.

2.- Solución de Tris-HCl pH 7.4 1 mol/L.

3.- Solución de NaCl 1.5 mol/L y 0.5 mol/L de Tris-HCl pH 7.4

Después de los lavados se dejaron secando 30 minutos a temperatura ambiente.

El DNA se fija a la membrana con luz U.V.

Para eliminar el "debris" celular, las membranas se lavaron durante 30 minutos a 55°C con una solución 5X de SSC y 0.5% de SDS. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

Se continuó con el protocolo para el ensayo de "Southern blot"

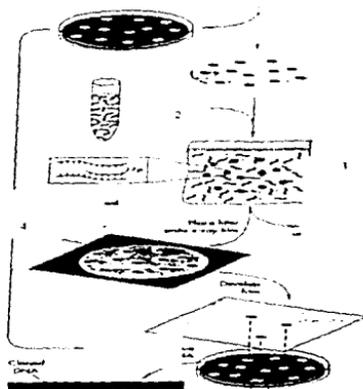


Fig. 9 Técnica de hibridación en colonia. 1) La membrana estéril se coloca sobre la placa de agar. 2) La membrana se retira y se fija el DNA a la membrana con luz U.V. 3) Hibridación contra la sonda específica. 4) Exposición de los filtros. 5) Con la placa de autoradiografía es posible detectar las colonias positivas y seleccionarlas de la caja original.

Obtención de plásmido por lisis alcalina. (MINIPREP)

Se colocaron en tubos eppendorf estériles 1.5 ml de cultivo de 18 h de cada una de las clonas positivas. Se centrifugaron a 12 000 x g a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se retiró el sobrenadante y el "pellet" se resuspendió en 100 µl de Glucosa mix (glucosa 50mmol/L, 10 mmol/L de EDTA y 25 mmol/L Tris HCl pH 8.0) adicionada con 6 mg de lisozima y 100 µl de una solución de 10 mg/ml de RNasa I por cada 2 ml de Glucosa mix.

Los tubos se dejaron incubando durante media hora en hielo. Después del tiempo de incubación se añadieron 100 µl de una solución de NaOH 0.2N / SDS 1%. Los tubos se agitaron por inversión lenta hasta que la mezcla de bacterias: Glucosa mix- NaOH/SDS se volvió transparente. A la mezcla anterior se le adicionaron 75 µl de una solución de acetato de sodio 3M a pH 5.5 y se agitaron por inversión hasta que se formó un precipitado grumoso de color blanco, dejándose los tubos en hielo durante 15 minutos. Después de esta incubación se centrifugaron a 12 000Xg en frío durante 10 minutos.

Se transfirieron 220 µl del sobrenadante a tubos eppendorf nuevos y se les adicionó el mismo volumen de fenol saturado con agua. Los tubos se centrifugaron 10 minutos a 12 000Xg. Después de esta centrifugación se añadieron 600 µl de etanol absoluto frío y se dejaron toda la noche precipitado a -70°C.

Para la recuperación del DNA plasmídico, los tubos se centrifugaron a 12 000Xg durante 15 minutos en frío, el "pellet" se secó al vacío durante 30 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

Secuenciación

Para la secuenciación de los fragmentos clonados , se empleó el método de Sanger.(43)

Obtención de cadena sencilla

De cada una de las colonias identificadas como positivas por hibridación se tomó una asada para inocular 5 ml de medio LBamp. Los precultivos se dejaron toda la noche (18 h) en una incubadora con agitación a 37°C a 200 rpm.

De los cultivos O.N. se tomaron 200 µl y se inocularon 20 ml de medio LBamp en un matraz Erlenmeyer de 200ml, y se incubaron a 37°C con agitación constante hasta que su crecimiento generara una densidad óptica entre 4.0 y 6.0. Los cultivos anteriores fueron inoculados con 10 µl del fago helper M13K07 (39). Los cultivos anteriores se incubaron 30 min sin agitación a 37°C y 30 min con agitación rápida aprox. 350 rpm a la misma temperatura. Con 200 µl de los cultivos infectados con el fago se inocularon 6 ml de medio LBamp adicionado con kanamicina al 0.5%. Los cultivos se dejaron toda la noche a 37°C con agitación contante (350rpm)

Se transfirieron 1.5 ml de cada uno de los cultivos infectados a un tubo eppendorf estéril, y se centrifugaron a 12,000g por 5 minutos a temperatura ambiente en una microfuga.

1.2 ml de los sobrenadantes anteriores se transfirieron a un tubo nuevo y estéril, a los cuales se les adicionó 300 µl de una solución de polietilenglicol al 20% en NaCl 2.5mol/L, mezclándose cuidadosamente y se incubaron 30 min. a temperatura ambiente.

Después del tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a12,000g durante 15 minutos en una microfuga. Los "pellet's" resultantes se secaron con papel absorbente cuidando de eliminar todo los restos de polietilenglicol. Los "pellet's" se resuspendieron en 200 µl de amortiguador TE pH 8.0. A cada uno de los tubos se le adicionó un volumen igual de fenol saturado en agua, se agitaron en el vortex y se separaron las dos fases por microcentrifugación a 12,000g en frío. Durante las extracciones con disolventes orgánicos se recupera siempre la fase acuosa que es la superior. A las fases acuosas obtenidas se les extrajo una vez más con fenol saturado en agua, una vez con una mezcla fenol-cloroformo (1:2) y por último una extracción con cloroformo,permitiendo cada vez que las fases se separen por centrifugación en frío.

Las fases acuosas obtenidas al final de las extracciones se precipitaron con 1/10 de este volumen de acetato de sodio 2M y 2 1/2 volúmenes de etanol al 100%. Se dejaron precipitando una hora a -70°C.

Se recuperaron los precipitados por centrifugación en frío durante 20 minutos a 12,000g y se secaron al vacío durante 1 hora. Los precipitados se lavaron tres veces con etanol al 75% dejando en hielo durante 30 min cada vez que el etanol se adicionaba, y recuperándolo nuevamente por centrifugación a 12,000 X g.

Los precipitados se resuspendieron finalmente en 15 µl de amortiguador TE pH 7.5 y se guardaron a -70°C. Las reacciones de secuenciación se hicieron según instrucciones del kit de USB Sequenase (ver 2.0). Las muestras se corrieron en geles al 4% y al 6% de acrilamida en condiciones desnaturalizantes, en un gradiente de acetato de sodio 3 mol/L.
(45)

Ensayos de hibridación

Todas las sondas empleadas fueron marcadas con 10 μCi de dCTP ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$), con el kit de "Nick-Translation" de la casa comercial Amersham. Todas las sondas se emplearon con una actividad específica mínima de 1.4×10^6 cpm/ μg de DNA. Para verificar la cantidad de cuentas incorporadas se empleó el método de precipitación con TCA en un contador de centelleo (BEKMAN LS6000SC).

"Northern blot"

Obtención de las membranas para hibridar.

El análisis de "Northern blot" (46), se realizó por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5% desnaturalizante (con formaldehído al 17%), 20 μg de RNA total por carril. Como amortiguador de corrida se utilizó MENP 1X (4.18 g de MOPS, 0.68 g de acetato de sodio, 0.37 g de EDTA y 20 ml de una solución de fosfatos de Na^+ y K^+ 1mol/L a pH 6.9). Para aplicar al gel cada una de las muestras: éstas se mezclaron con 5 ml de una solución de muestras (400 μl de formamida desionizada, 120 μl de formaldehído al 37% y 90 μl de MENP 10X), y se calentaron durante 10 minutos a 65°C. Después se les adicionaron 5 μl de colorante para RNA (50% glicerol, 1mM de EDTA, 10 mM de fosfatos de Na y K pH 6.9 y 0.05% de azul de bromofenol) y se cargaron en el gel. La electroforesis se corrió a 1mA/cm² en el cuarto frío, durante tres horas.

Los geles fueron transferidos por capilaridad a una membrana de Nylon (Amersham) y el RNA se fijó a la membrana por entrecruzamiento con luz U.V con ciclos de 0.125 J/cm² (3-4 ciclos).

Condiciones de hibridación.

Las membranas de Nylon se prehibridaron durante 4 horas a 55 °C en una solución preparada con formamida desionizada al 35%, 10% de dextrán sulfato, SSPE 5X, solución Denhardt 5X, 1% SDS y 5 mg/ml de DNA inespecífico (esperma de salmón) en una bolsa de polietileno sellada. Después de este tiempo, se le adicionaron 200 µl de la sonda específica marcada con dCTP α -³²P. Se dejaron hibridando durante 16 horas a 55°C.

Los filtros se lavaron dos veces con una solución de SSC 0.2% (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15mM, pH 7.4) y 0.2% de SDS durante 15 minutos a 55°C cada vez.; dos veces con SSC 0.1% y SDS 0.1% por 15 minutos cada vez y finalmente con SSC 0.1X durante 15 minutos solo una vez a la misma temperatura.

Autoradiografía.

Se utilizaron placas para autoradiografía (Kodak X Omat) que se expusieron en presencia del filtro de 7 a 10 días. Los cassettes se guardaron a -70°C. Las placas se revelaron con los reactivos indicados por el fabricante.

"Southern blot"

Preparación de las membranas.

Se corrió una electroforesis en un gel de agarosa al 1% o en acrilamida al 7.5% (productos de PCR). Después de la corrida los geles se trataron con una 100 ml de una solución desnaturante (NaOH 0.5 mol/L y NaCl 1 mol/L) dos veces durante 15 minutos y dos veces durante el mismo tiempo con solución neutralizante (NaCl 1.5 mol/L y Tris-HCl 1 mol/L, pH 7.5)

Los geles así tratados fueron transferidos por capilaridad a una membrana de Nylon.(49)

Las condiciones de hibridación y lavado fueron de alta astringencia, con la misma técnica empleada para el "Northern blot". Las placas se expusieron 24 horas a -70°C .

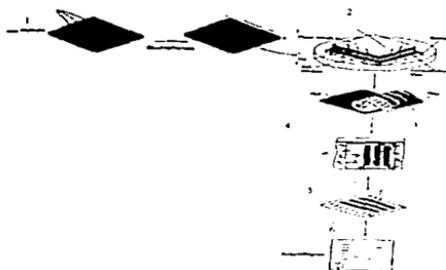


Fig 10. Esquema general del análisis de ácidos nucleicos por Southern blot (DNA) y Northern blot (RNA). 1) Aplicación de las muestras para electroforesis. 2) Transferencia por capilaridad. 3) Membrana. 4) Hibridación de la membrana contra la sonda específica. 5) La sonda hibrida con la secuencia complementaria en la muestra. 6) Placa de autoradiografía.

Ensayos 5' y 3' RACE (Rapid Amplification cDNAs Ends) empleando los kits de GIBCO*

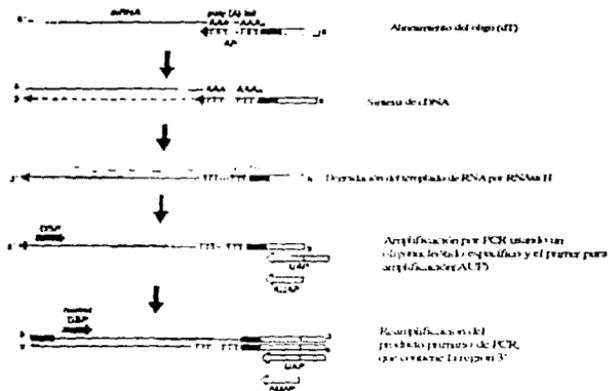


Fig 11. Esquema de reacción para lograr la amplificación del extremo 3' con el kit 3' RACE. Esta reacción se basa en la amplificación de la región 3' del gene mediante el empleo de un oligonucleótido antisense (down) poli dT, que le permite unirse a la región de poliadenilación del mensajero. El primer sense (up) es específico para el gene deseado.

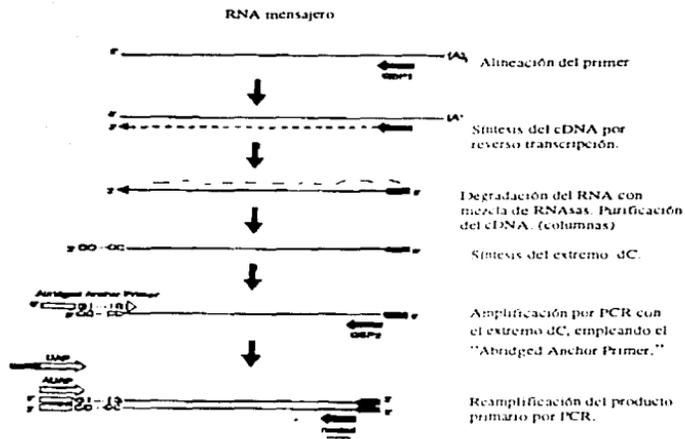


Fig. 12 Esquema de la reacción para amplificar la región 5' con el kit 5' RACE .

Esta reacción se basa en la síntesis de una cola de poli dC, en el extremo 5' del cDNA por la enzima dideoxynucleotidil transferasa. Se lleva a cabo la amplificación de la región específica conteniendo el extremo 5' del gene empleando un primer que se alinea con la región poli dC y otro denominado "nested primer" específico para el mensajero que se desea amplificar.

Se emplearon 5 µg de RNA de hígado completo de cuyo (sin digerir) para hacer ambos ensayos. Para cada una de las reacciones se siguieron las instrucciones previstas por los fabricantes.

RESULTADOS

I Caracterización molecular del subtipo de receptor α_1 adrenérgico en los hepatocitos de cuyo.

Para lograr la caracterización molecular del subtipo de receptor α_1 presente en los hepatocitos de esta especie, se empleó la técnica de RT-PCR. Se emplearon oligonucleótidos específicos para amplificar una región central de 316 pb. Esta región abarca el VI y el VII dominio transmembranal. Estos oligonucleótidos ya han sido reportados por Gozob Tzujimoto y colaboradores (49) para detectar la presencia del mensajero para el subtipo α_1 .

En estos ensayos aún no se contaba con oligonucleótidos que permitieran amplificar regiones específicas para el subtipo α_{1a} , por eso no es posible asegurar la existencia o no de este subtipo en estas muestras.

Para los ensayos de RT-PCR se emplearon 5 mg de RNA total de hepatocitos aislados de cuyo por el método ya descrito. La reverso transcripción se llevó a cabo durante una hora a 42°C, completando el ciclo con 15 minutos a 72°C para inactivación de la RT. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en nuestro laboratorio: 1 min a 94°C, 1 min a 60°C para alineamiento del oligo y 1 min a 72°C para extensión; durante 35 ciclos.

Se tomaron 10 μ l del producto de RT-PCR para correr en geles de poliacrilamida al 7.5% por triplicado. Estos geles fueron transferidos a papel de nylon para su hibridación contra cada una de las sondas para detectar a los tres subtipos de receptores clonados.

En todos los ensayos de RT-PCR se corrió una muestra sin transcriptasa reversa como control de la amplificación de regiones específicas generadas a partir de un cDNA. Como controles positivos de amplificación con los oligonucleótidos y de hibridación se

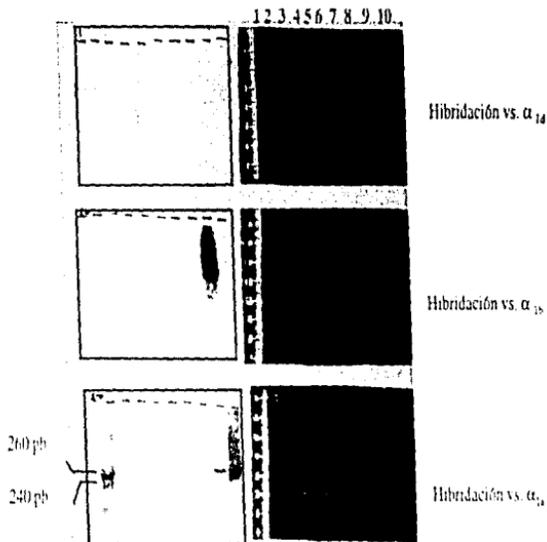


Fig.13 Southern blot. Productos de RT-PCR obtenidos a partir de muestras de RNA de hepatocitos aislados. Se obtuvieron dos fragmentos que hibridan en condiciones de alta stringencia solo contra una sonda específica para el subtipo α_{14} . Cada una de las hibridaciones tiene un control positivo, generado a partir de muestras de RNA de células Rat-1 que tienen transfectado cada uno de los subtipos de receptores clonados. Como en estos experimentos aún no contábamos con oligonucleótidos específicos para amplificar el subtipo α_{14} , la hibridación no tiene control positivo. En el carril 7 se encuentra un control sin transcriptasa reversa. Carril 8 λ -BstE II

emplearon muestras de RNA de células Rat-1(fibroblastos) que tienen transfectados los tres subtipos de receptores α , adrenérgicos.(52)

En estos ensayos en lugar de obtener el producto de 316 pb que se esperaba, se obtuvieron dos productos de PCR uno de 260 y otro de 240 pb en las muestras de cuyo . Estos dos fragmentos hibridan en alta astringencia solo contra una sonda específica para el subtipo α_{1A} .

Ambos fragmentos fueron purificados por el método de centrifugación por columna. Ya purificados se empleó aproximadamente 1 μ g de este DNA para hacer la reacción de ligación con los vectores pTZ19 U y el pCRSk+. Con los productos de ligación se transformaron bacterias pertenecientes a la cepa JM103 de *E. coli*.

De los ensayos de ligación anteriores se obtuvieron 28 colonias transformantes, 24 de ellas con el vector pTZ19U y 4 con el vector pCRSk+.

Para comprobar que estas clonas tuvieran el inserto, se extrajo el plásmido por el método de lisis alcalina y se corrieron en gels de agarosa al 1%.

Los plásmidos se transfirieron a papel de nylon y se hibridaron contra la sonda específica para el α_{1A} . Los ensayos de "Southern blot" demostraron que solo 5 clonas contenían el inserto. Las clonas positivas por hibridación se analizaron por secuenciación, obteniéndose una similitud en nucleótidos del 65% con respecto a la secuencia del cDNA reportado para el subtipo α_{1A} clonado de bovino. Esta similitud se incrementó hasta el 76% en secuencia de aminoácidos.

Se esperaba una similitud mayor con respecto a la secuencia reportada de bovino , sin embargo en función a los ensayos de hibridación y la homología en aminocidos, se comprueba que ambos fragmentos pertenecen al receptor α_{1A} .

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



Fig.14 Plásmidos obtenidos de las clonas positivas. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Carril 1 λ + BstE II, 2-20 muestras de plásmido con en vector pTZ19U.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

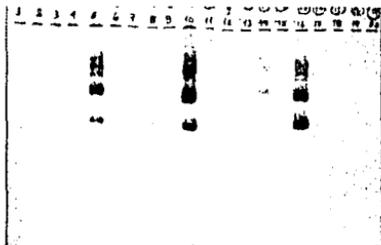


Fig. 15 Placa de autoradiografía. Hibridación de los plásmidos con una sonda específica para el subtipo α_{1A} .

II. Ensayos para lograr la clonación de la región codificante completa a partir de RNA total obtenido de células aisladas.

Para tratar de obtener la región codificante completa de este receptor, se empleó también la técnica de RT-PCR. Se utilizó como estrategia la amplificación de la región 5' y 3' individualmente, mediante el empleo de oligonucleótidos que permitieran el alineamiento con la región poli A del mensajero en el caso del extremo 3'. Para lograr amplificar la secuencia 5' se utilizaron secuencias aleatorias de 6 pb (hexámeros al azar). En estos ensayos para asegurar la amplificación de las regiones pertenecientes al mensajero del α_1 , se empleó un juego de oligonucleótidos específicos para el subtipo reportado, el α_{1A} . Se utilizaron diferentes combinaciones "up" y "down" con los "primers" mencionados arriba. La estrategia utilizada con estos "kits" se encuentra con detalle en material y métodos. Se emplearon diferentes patrones de amplificación y se probaron distintas condiciones de alineamiento para los oligonucleótidos, sin embargo en ninguno de los ensayos anteriores se obtuvieron resultados positivos.

Cabe mencionar que en todos los ensayos se corrió un control interno de la preparación de RNA, que consiste en la amplificación con oligonucleótidos específicos de regiones pertenecientes al gene de la enzima GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Se emplea como control porque su mensajero es de los más estables en muestras de RNA hepático. En los ensayos de amplificación para las regiones 3' y 5' del mensajero para el α_1 , los controles anteriores siempre fueron positivos; lo cual es un indicador grueso de que las preparaciones de RNA de las cuales se partió eran adecuadas.

En función de los datos anteriores, en los cuales se demuestra que no es posible amplificar los extremos del gene, el no haber podido amplificar el fragmento perteneciente a la región central con los oligonucleótidos reportados, además de la demostración por amplificación con la GAPDH de la integridad de las preparaciones, se

pensó en la posibilidad de una degradación diferencial del RNA mensajero específico para el receptor α_1 de células aisladas.

Para comprobar dicha hipótesis se diseñó un experimento que permitiera poner de manifiesto las modificaciones en la expresión de este mensajero durante el proceso de aislamiento de las células. Nuestros experimentos consistieron en seguir temporalmente el curso de la expresión de este mensajero, por RT-PCR, durante el proceso de disgregación del hígado. Para ello, se extrajo RNA de distintas muestras de tejido en cada uno de los pasos seguidos para el aislamiento de los hepatocitos. Como referencia o basal se empleó una muestra de RNA total de hígado completo sin digerir ni lavar.

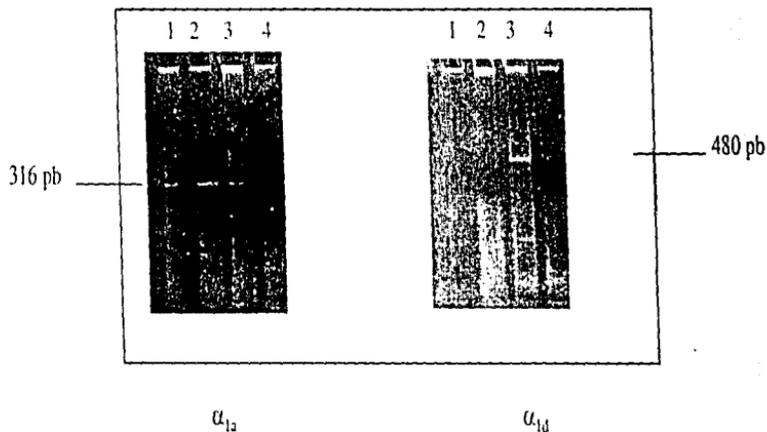


Fig. 16 A Cursos temporales por RT-PCR, de las distintas muestras de RNA obtenidas de hepatocitos durante su aislamiento. 1) Producto de RT-PCR hígado completo 2) Hígado lavado con Krebs Ringer 3) Hígado digerido 5 min. con colagenasa 4) Hepatocitos aislados. Se emplearon oligonucleótidos específicos para cada uno de los subtipos señalados. Geles de poliacrilamida al 7.5% teñidos con bromuro de etidio.

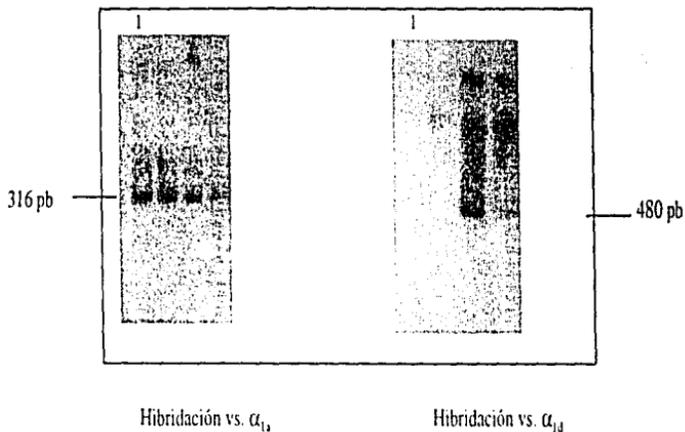


Fig. 16 B Southern Blot. Hibridación de los productos de RT-PCR con cada una de las sondas señaladas arriba. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región central del α_{1s} fueron los reportados por Gozoh T.(49) Los oligonucleótidos para amplificar la región del α_{1d} se diseñaron especialmente para este experimento.

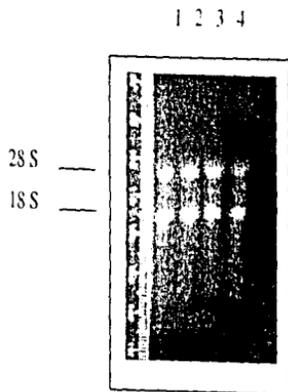


Fig. 16 C Muestras de RNA obtenidas de hígado durante su disgregación. 1) Hígado completo 2) Hígado lavado con Krebs Ringer 3) Hígado digerido 5 min. 4) Hepatocitos aislados

Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio.

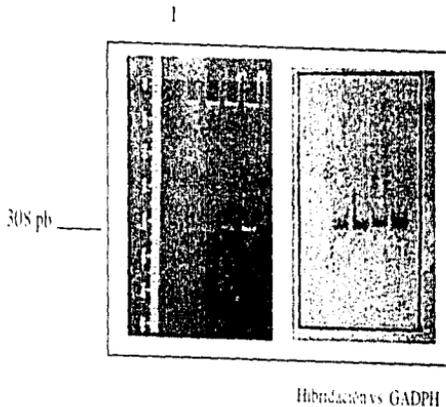


Fig. 16 D. Southern blot. Productos de RT-PCR de las muestras anteriores empleando oligonucleótidos específicos contra GAPDH.

La hibridación se llevó a cabo con la sonda específica.

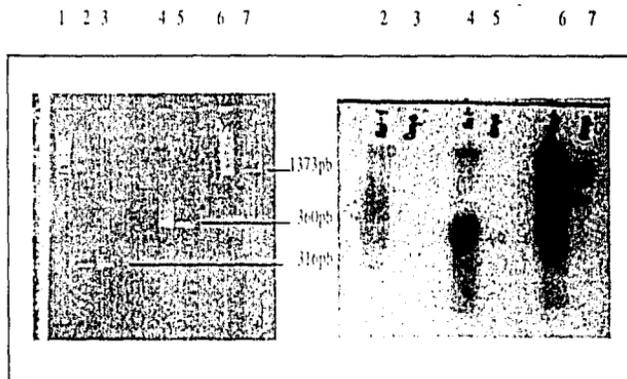
III. Obtención de la región codificante completa a partir de muestras de RNA de hígado completo.

Debido a que el RNA de hepatocitos aislados no se logró la amplificación de los extremos 5' y 3' del gene, en tanto que en muestras de hígado completo pudo amplificarse el fragmento de 316 pb esperado y este pertenece al subtipo α_{1a} , porque hibrida en condiciones de alta astringencia con una sonda específica, decidimos obtener el cDNA que contiene a la región codificante completa, partiendo de muestras de RNA de hígado completo.

Los primeros ensayos para obtener los extremos se llevaron a cabo empleando los kits 5' y 3' RACE (rapid amplification of cDNAs ends) de GIBCO*, con muestras de RNA obtenidas de hígado completo, empleando 5 μ g de RNA total.

Sin embargo, en ninguno de estos ensayos se obtuvieron resultados positivos, ya que nunca se logró amplificar fragmentos del peso molecular esperado ni ningún producto que hibridara con la sonda específica para el α_{1a} .

Debido a lo anterior y para tratar de amplificar la región codificante completa, a partir de la secuencia del receptor α_{1a} clonado de bovino, se diseñaron un par de oligonucleótidos cuya secuencia pertenece a las regiones amino y carboxilo terminales de estas regiones. Estos oligonucleótidos se nombraron como ATG (codón de inicio) y como GSP2 (que aparece con una región 30 pb "downstream" al codón de término). El tamaño del fragmento generado por estos oligonucleótidos se esperaba alrededor de 1380 pb.



Hibridación vs α_{1a}

Fig. 17 Southern blot. Se muestran los fragmentos de RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos para amplificar distintas regiones pertenecientes al receptor α_{1a} . Carril 1) λ + BstE II 2 y 3 Producto de PCR con los oligonucleótidos ya reportados para la región central del receptor. (316 pb) Muestras de células Rat-1 y cuyo respectivamente. 4 y 5 Productos de RT-PCR con la combinación de oligonucleótidos up (reportado) y GSP2 . Fragmento de 630 pb. 6 y 7 Productos de RT-PCR con los oligos ATG/ GSP2 (1373 pb). Se hizo la hibridación con la sonda para el α_{1a} .

Todos los fragmentos anteriores fueron purificados por el método de centrifugación en columna y puestos a ligar con los vectores pCRSK+ y pTZ19E. Se transformaron bacterias de la cepa JM103 de *E. coli* competentes con cloruro de hexamincobalto en cada uno de los fragmentos amplificadas. Estas bacterias se extendieron en medio LB con ampicilina y se seleccionaron por el método de α complementación. Las colonias blancas se parcharon sobre membranas de Nylon y se hibridaron con una sonda específica para el α_{II} .



Control (+) hibridación

Fig. 18 Placa de autoradiografía en donde se muestra la hibridación de colonias que contienen el plásmido con el fragmento up/down, por el método de hibridación en colonia.

De los eventos de ligación anteriores se obtuvieron 3 clonas positivas con el inserto up/down (360 pb), con el vector pTZ19U, 5 clonas positivas con el mismo vector con el fragmento up/GSP2 y 2 con el fragmento ATG/GSP2. De las clonas positivas anteriores, se extrajeron cadenas sencillas y se secuenciaron por el método de Sanger. Se secuenciaron en promedio 270 pb pertenecientes a cada una de las clonas positivas con el inserto de 316 pb (up/down). La similitud de estas secuencias con la secuencia del cDNA que codifica para el subtipo α_{1a} , clonado de bovino fue del 90% en nucleótidos y del 88% en proteína.

DISCUSION

El objetivo central del presente trabajo consistió en la caracterización molecular del subtipo del receptor α_1 adrenérgico que se expresa en los hepatocitos de cuyo, mediante la clonación del cDNA que codifica para el mismo. El objetivo que se perseguía con esta clonación era explicar la inconsistencia que existe entre los resultados generados por ensayos tipo "Northern blot" realizados por nuestro grupo en el año de 1992, en donde se demostraba la presencia de RNA mensajero para el subtipo α_1 , siendo que el subtipo que expresa esta especie es el α_1 .

Como estrategia inicial para la caracterización molecular de este receptor se empleó la técnica de RT-PCR, que permitió, partiendo de muestras de RNA total obtenidas de hepatocitos aislados, la obtención de 2 fragmentos, uno de 260 y otro de 240 como resultado de la amplificación con oligonucleótidos (up/down) reportados para la amplificación de una región central de este subtipo con un tamaño de 316 pb. Estos dos fragmentos hibridaron en condiciones de alta astringencia con una sonda específica (Fig.13). La secuencia de estos dos fragmentos subclonados en vectores plasmídicos tiene una similitud promedio al 65% en nucleótidos con la secuencia del cDNA para este subtipo clonado de bovino, porcentaje que aumenta al 75% cuando se traduce a proteína. Aunque su similitud en secuencia es más baja a la esperada (90-95%) se puede concluir que éstos fragmentos pertenecen a un receptor del subtipo α_1 adrenérgico. En estos ensayos se esperaba la amplificación de un solo fragmento de 316 pb, aunque se probaron distintas condiciones de amplificación, no pudo obtenerse el fragmento anterior.

El hecho de haber obtenido 2 fragmentos de menor tamaño con una similitud en secuencia baja y la imposibilidad de amplificar los extremos 3' y 5' del gene en muestras de RNA de células aisladas, podrían indicar la degradación diferencial de este mensajero. En todos estos ensayos siempre se corrió un control interno de las preparaciones, en

donde se logran amplificar fragmentos pertenecientes al cDNA que codifica para la GAPDH.

En los ensayos donde se pretendió demostrar esta degradación mediante la cinética de expresión de este mensajero durante el proceso de aislamiento de las células (Figs. 16) , puede observarse que la señal de hibridación para el subtipo α_1 disminuye conforme el proceso de aislamiento avanza, esto es en tejido íntegro o sea en el hígado completo, por RT-PCR se obtiene un solo fragmento de 316 pb que hibrida en condiciones de alta stringencia contra el α_1 , en contraparte, la cantidad de este producto disminuye en muestras de RNA de células aisladas.

Se ha demostrado que el proceso de aislamiento de los hepatocitos con colagenasa produce alteración en la expresión de distintos genes en el hígado (53), en parte debido a que la colagenasa degrada la matriz extracelular que mantiene unidas a las células hepáticas conformando el tejido. Se ha propuesto que las interacciones célula- matriz extracelular regulan el proceso de diferenciación en los hepatocitos de rata , precisamente porque el uso de la colagenasa para la disgregación del tejido hepático, al menos en la rata, produce un cambio en el patrón de transcripción de genes como *c-myc*, *c-fos* y *jun-b*. El aumento en los niveles de transcripción de estos genes se relaciona con procesos como la diferenciación y proliferación celular (55-59). En nuestro laboratorio se ha reportado que otros receptores acoplados a mismo sistema de transducción que los α_1 , como los receptores a angiotensina II modula la expresión de *c-fos* en hepatocitos aislados (63-64). Siendo el gene que buscamos, un gene que codifica para una hormona cuya acción se ha relacionado con procesos de proliferación, aunque de manera tardía con respecto a las respuestas inmediatas que la adrenalina produce en el hígado, cabe la posibilidad de que su transcripción sea regulada también por este tipo de interacciones.

Con la demostración de la degradación diferencial del mensajero para el subtipo α_{1A} en hepatocitos aislados, en conjunto con la demostración del aumento en la transcripción del mensajero para el subtipo α_{1D} , puede explicarse el porque en los ensayos tipo

"Northern blot" hechos en 1992 hubo señal de hibridación positiva con una sonda específica para este subtipo.

Como el RNA mensajero para el subtipo α_{1A} está degradado en muestras de RNA obtenidas a partir de células aisladas, éste se encuentra en baja cantidad, lo cual no permitió ponerlo en evidencia en los ensayos de "Northern blot" que es una técnica poco sensible para demostrar la presencia de mensajeros poco representados en muestras de RNA total, debido a que las poblaciones de mensajeros representan el 3% del RNA total de una célula.

Como en los ensayos de Northern se demostró hibridación con una sonda específica para el subtipo α_{1B} , se diseñaron un par de oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de 480 pb perteneciente a la región central (V y VI transmembranal) de este subtipo. Los oligonucleótidos anteriores fueron probados con RNA de células Rat-1 que tienen transfectado el receptor subtipo α_{1B} ; en estas muestras se obtuvo un fragmento de 480 pb que hibrida en condiciones de alta astringencia con una sonda específica para este subtipo. De diferentes ensayos para determinar las condiciones de amplificación se obtuvo que la temperatura de alineamiento del oligonucleótido es de 55°C, con una extensión de 7 minutos a 72°C, durante 35 ciclos.

Al probar estos oligonucleótidos con cada una de las muestras obtenidas durante el proceso de aislamiento de las células, se puso en evidencia que el mensajero para este subtipo no se encuentra en tejido íntegro, en cambio en las muestras de hígado digerido durante 5 y 20 minutos, y en las muestras obtenidas de células aisladas, sí existe este mensajero, porque por RT-PCR se obtienen a partir de éstas, un fragmento del tamaño esperado (480 pb) que hibrida en condiciones de alta astringencia con una sonda específica.

Estos ensayos ponen en evidencia la posibilidad de una transición del subtipo de receptor α_1 adrenérgico durante el proceso de aislamiento de las células. Los resultados anteriores ponen de manifiesto cambios en la transcripción de los mensajeros, cambios que ocurren mucho más rápido que los cambios en expresión. Esto explica porqué en membranas de hepatocitos recién aislados no es posible detectar por "binding" la presencia del subtipo α_{1b} , a pesar de que por RT-PCR se puede detectar el mensajero para el mismo.

El tiempo real de aislamiento de las células no es mayor a 15 minutos posteriores a la digestión con colagenasa, este tiempo no es suficiente como para poder apreciar un cambio en la proteína que se expresa en la membrana de los hepatocitos. Por eso el subtipo que puede identificarse por "binding" es el α_{1a} .

Estos ensayos son sólo un indicio de la posibilidad de una transición de subtipos, que aunque no en condiciones fisiológicas, bien podrían ocurrir en procesos que alteren esas condiciones, como hepatectomía parcial, transformación maligna o metástasis, entre otros. La obtención de datos de "binding" con membranas de hepatocitos cultivados podrá confirmar las observaciones anteriores.

Existen evidencias de una transición, pero de tipos de receptores adrenérgicos en el hígado de ratas jóvenes donde la acción adrenérgica es mediada predominantemente por receptores α_1 ; en procesos como la diferenciación de hepatocitos, estos efectos son mediados predominantemente por receptores del tipo β_1 . (54)

Se ha comprobado también que durante la regeneración, después de la hepatectomía parcial en ratas, los niveles de RNA mensajero para subtipo α_{1a} cambian. Además en función a que sus niveles de transcripción aumentan después del nacimiento, se ha propuesto al mensajero para el subtipo α_{1a} como un marcador de maduración celular y diferenciación del tejido hepático. (54,60)

Esto hace pensar con respecto a la multiplicidad de subtipos para los α_1 , que reconocen a las catecolaminas endógenas adrenalina y noradrenalina con una afinidad muy similar, además de activar el sistema de transducción con la misma eficacia; que en condiciones normales hepáticas, la presencia de un subtipo u otro no es relevante para responder a la hormona adrenalina en condiciones de estrés. Sin embargo, la habilidad de estos subtipos para expresarse de manera diferencial durante el desarrollo y la posible transición de subtipos por alteración de la matriz extracelular, ponen de manifiesto que la relevancia de conservar evolutivamente estos subtipos es precisamente su relación con procesos a más largo plazo como proliferación y diferenciación celular generados por acción adrenérgica.

Como en las muestras de RNA obtenidas de células aisladas no fue posible lograr la amplificación de las regiones 5' y 3' seguramente porque el RNA se está degradando, empleamos RNA de hígado completo para tratar de clonar la región codificante completa.

Se utilizaron inicialmente los kits 5' y 3' RACE para amplificar ambos extremos. En ninguno de estos ensayos se obtuvo resultado positivo. En los ensayos 5' se obtuvieron una serie de fragmentos que hibridaban contra la sonda específica para el subtipo α_{1A} ; sin embargo ninguno tenía el peso molecular esperado y las cantidades que se obtenían por reamplificación de los fragmentos más grandes (1130 pb) no eran suficientes como para purificarlas y ligarlas en vectores plasmídicos.

La amplificación de la región 3' quizá no fue posible debido a que la región no traducida es de aproximadamente 914 pb (tamaño de la región 3' no codificante del cDNA obtenido de bovino), lo que en conjunto con el tamaño de la región codificante esperada (900 pb porque se usa como oligonucleótido antisense el oligonucleótido up ya reportado) dan como resultado un fragmento de casi 2.0 kb, un fragmento muy grande que es difícil de amplificar por PCR.

La región 5' del cDNA que codifica para el subtipo α_1 , en el bovino contiene una región de 94 pb no traducida, rica en secuencias GC, lo que aumenta la posibilidad de la formación de estructura secundaria en esa región a la temperatura a la que se lleva a cabo el apareamiento de los oligonucleótidos (55°C), lo cual impidió este proceso, no permitiendo la amplificación de esa zona en las muestras de cuyo. En función de los resultados anteriores se diseñaron un par de oligonucleótidos (ATG/GSP2) que aparean con los extremos 5' y 3' respectivamente de la región codificante completa de este subtipo. Estos oligonucleótidos fueron probados con RNA de células Rat-1 que tienen el receptor α_1 , transfectado para montar condiciones de amplificación de un fragmento de 1370 pb.

Las condiciones de amplificación bajo las cuales este fragmento pudo obtenerse fueron: apareamiento de los oligonucleótidos (annealing) a 55°C 1 minuto, extensión a 72 °C 7 minutos, acompañados de 2 minutos de desaturación a 94°C al inicio de cada ciclo. El número de ciclos empleados fue de 35. Bajo estas condiciones de amplificación se obtuvo un fragmento de 1373 pb, que hibridó en condiciones de alta estrictancia contra la sonda específica para el subtipo α_1 .

Después de montadas estas condiciones, los oligonucleótidos se probaron con las muestras de RNA de hígado completo de cuyo y pudo obtenerse un fragmento de igual tamaño, aunque en menor cantidad que los controles como se muestra en la figura no.16.

El fragmento anterior fue clonado en un vector plasmídico y la región que ha podido obtenerse de la secuencia (250 pb) tiene una similitud en nucleótidos del 95% con respecto a la secuencia reportada para bovino.

Para comprobar que se tiene el marco de lectura completo es necesario terminar de secuenciar el fragmento completo, además de analizar varias clonas con el fin de corregir errores durante la secuencia o bien los errores generados por la amplificación llevada a cabo por *Taq* polimerasa.

Los datos moleculares (hibridación y secuencia) obtenidos durante mi trabajo de tesis comprueban que el fragmento del receptor subclonado en el vector pTZ19U pertenece al subtipo α_{1A}

Solo mediante la transfección de este fragmento, clonado en un vector de expresión eucariote en líneas celulares modelo, que permita hacer estudios funcionales de la proteína que éste codifica, se podrá confirmar si pertenece o no al gene esperado.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- El receptor α_1 adrenérgico presente en el hígado del cuyo caracterizado molecularmente corresponde al subtipo α_{1A} . Esta clasificación se basa en que, en muestras de RNA aisladas de hígado completo, se logró la amplificación de un fragmento de 316 pb que corresponde a una región central de este subtipo. Este fragmento hibrida en condiciones de alta astringencia con una sonda específica.
- Se encontró también que, la transcripción del RNA mensajero para el subtipo α_{1A} disminuye conforme avanza el proceso de aislamiento de los hepatocitos, incrementándose a su vez, la transcripción del mensajero para el subtipo α_{1B} .
- La transición de subtipos durante el proceso de aislamiento de los hepatocitos, puede deberse a alteraciones generadas por la acción de la enzima colagenasa sobre las interacciones célula-matriz extracelular existentes entre los hepatocitos. Este fenómeno de transición explica el porque en ensayos tipo "Northern blot" con RNA total de células aisladas no se haya podido detectar la presencia del subtipo α_{1A} , que es el subtipo caracterizado por "binding". Esta transición explica también la señal de hibridación positiva con una sonda específica para el subtipo α_{1B} .
- Se determinaron las condiciones experimentales para la amplificación por RT-PCR de tres fragmentos pertenecientes al receptor α_1 adrenérgico presente en el hígado del cuyo (316 pb, 630 pb y 1373 pb) que hibridaron en condiciones de alta astringencia con una sonda para el subtipo α_{1A} . El fragmento de 1373 pb corresponde a la región codificante completa de este gen.

-Los fragmentos anteriores fueron subclonados en vectores plasmidicos. El análisis de una secuencia parcial de estos fragmentos, reveló una similitud promedio del 95% en secuencia de nucleótidos con secuencias ya reportadas para el subtipo α_{1A} obtenidas por clonación de otras especies

Apéndice

Preparación de soluciones.

TBE 10 X 108 g de Tris base
55 g de ácido bórico
40 ml de una solución 0.5M de EDTA pH 8.0

Aforar a 1 L

SSC 20 X 175.5 g de NaCl
88 g de citrato de sodio

Esterilizar con vapor.

Aforar a 1 L

SSPE 20X 175.3 g de NaCl
27.6 g de NaH_2PO_4
7.4 g de EDTA (ácido etilen diamino tetracético)

Ajustar pH a 7.4

Aforar a 1L

TRI-REAGENT (extracción de RNA)

10 ml de solución D
10 ml de fenol saturado en agua
1 ml de acetato de sodio 2 mol/L pH 4.0
50 μl de β -mercaptoetanol

Se prepara fresco con pipetas estériles. Cada componente excepto el fenol debe esterilizarse por separado.

Solución D.

250 g de tiocinato de guanidina
293 ml de agua con DEPC (Dietilpicrocarbamato 0.2%) Inhibidor de RNA'sas
Añadir: 16.6 ml de citrato de sodio 0.75 mol/L pH 7.0
Añadir: 26.4 ml de Sarkosyl al 10%

Medios de Cultivo

LB (Medio Luria Bertani)

10 g de NaCl

10 g de peptona de caseína (GIBCO*)

5g de extracto de levadura (GIBCO*)

18 g de agar (sólo para medio sólido)

Disolver en 1L de agua.

Esterilizar

LB ampicilina

Por cada 100 ml de medio líquido se le adiciona 1 ml de una solución de ampicilina al 2.5%.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alberts Bruce., D. Bray., J. Lewis., M.Raff., K. Roberts & J.D. Watson. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. 2ª Ed. Garland Publishing, Inc. New York. pp 345-370
- 2.- García-Sáinz, J.A. (1987). Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación Celular. F.C.E. SEP; México.
- 3.- Perez D. J, Hwa J, Gaivin R, Brown F & Graham RM. (1996) Constitutive Activation of a Single Effector Pathway: Evidence for Multiple Activation States of a G Protein-Coupled Receptor. *Mol. Pharmacol.* 49:112-122
- 4.- Gilman GA (1987) Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu.Rev.Biochem.* 56:615-649.
- 5.- Neer E J. (1986) G proteins: Critical control points for transmembrane signals. *Prot.Sci.* 3: 3-14
- 6.- Ahlquist RP. (1948). A study of the adrenergic receptors. *Am.J. Physiol.* 153:586-600.
- 7.- Lefkowitz RJ & Caron MG.(1988). Adrenergic receptors: models for the study of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *J.Biol.Chem.* 263:4993-96.
- 8.- Lomasney JW, Cotecchia S, Lefkowitz RJ & Caron MG. (1991). Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and structure-function relationships. *Biochim.Biophys. Acta.* 1095: 127-42.
- 9.- Ford A, William T, Blue D & Clarke D. (1994) α 1-adrenoreceptor classification:Sharpening occam's razor. *Trends Pharmacol.Sci.* 15: 167-170.

- 10.- Guarino RD, Perez DM & Piasicik MT. (1996) Recent advances in the Molecular Pharmacology of the α 1-adrenergic receptors. *Cell. Signal.* 5:323-333
- 11.- Birnbaumer L, Abramowitz J, & Brown AM. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins *Biochim.Biophys. Acta.* 1031: 163-167.
- 12.-Leffkowitz RJ. (1996) G-protein-coupled Receptors and receptor kinases: From Molecular Biology to Potential Therapeutic applications. *Nature* 14:283-286
- 13.- Taylor SJ, Buechler JA & Yonemoto W. (1990) cAMP-dependent protein kinase:framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem* 59: 971-1005.
- 14.- Exton JH. (1981) Molecular mechanisms involved in a.adrenergic responses. *Mol.Cell.Endocrinol.* 23:233-264.
- 15.- Graham RM, Perez DM, Piascik MT, Rierk RP & Ilwa J. (1995) "Characterization of α 1 adrenergic receptor subtypes". En *Adrenoreceptors. Structure, function and Pharmacology.* Editado por Ruffolo R.R. Jr. pp 15-22.
- 16.- Faure C, Pimoule C, Arbulla S & Graham D. (1995) Expression of α 1-adrenoreceptor subtypes in human tissues by competitive RT-PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 213:935-943
- 17.- Romarao CS, Denker JMK, Perez DM, Gaivin RJ, Riek RP & Graham RM. (1992) Genomic organization and expression of the human α_1 adrenergic receptor. *J.Biol Chem.* 267: 21936-21945.

- 18.- Kanasaky M, Matsubara H, Murasawa S, Masaki H & Nio Y. (1994) cAMP responsive element-mediated regulation of the gene transcription of the alpha-1B adrenergic receptor by thyrotropin. *J.Clin.Invest* 94: 2245-2254
- 19.- Gao B & Kunos G. (1995) The rat α_{1B} adrenergic receptor gene middle promoter contains multiple binding sites for sequence-specific proteins including a novel ubiquitous transcription factor. *J.Biol Chem.* 270: 5614-5619
- 20.- Ishac EJN, Lazar-Wesley E & Kunos G. (1992) Rapid inverse changes in α_{1A} and β_2 adrenergic receptors and gene transcripts in acutely isolated rat liver cells. *J. Cell Physiol.* 152: 79-86
- 21.- Schwarz KR, Lanier SM, Carter EA, Homey CJ & Graham RM. (1985) Rapid reciprocal changes in adrenergic receptors in intact isolated hepatocytes during primary cell culture. *Mol. Pharmacol.* 27: 200-209
- 22.- MacGrath JC. (1982) Evidence for more than one type of post-junctional α -adrenoreceptor. *Biochem Pharmacol.* 31:467-484
- 23.- Corvera S, Bahena-Huerta J & García-Sáinz JA. (1982) Stimulation of ureogenesis through $\alpha 1$ and β -adrenoreceptors in juvenile rat hepatocytes. *Eur.J.Pharmacol.* 82:89-91
- 24.- Huerta-Bahena J, Villalobos-Molina R & García-Sáinz JA. (1983) Roles of alpha1 and beta-adrenergic responsiveness of liver cells formed after partial hepatectomy. *Biochim.Biophys. Acta.* 763: 112-119
- 25.- García-Sáinz JA & Nájera-Alvarado A.(1986) Hormonal responsiveness of liver cells during the liver regeneration process induced by carbon tetrachloride administration. *Biochim.Biophys.Acta.* 885:102-109

- 26.-Morrow A & Creese I. (1986) Characterization of α_1 -adrenoreceptor subtypes in rat brain: reevaluation of 3H WB4101 & 3H prazosin binding. *Mol Pharmacol*. **29**:321-330
- 27.- Cotecchia S, Swinn DA, Randall RR & Lefkowitz RJ. (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster α_1 adrenergic receptor. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7159-7163
- 28.-Swhwin DA, Lomasney JA, Lorenz W, Szklut PJ, Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ & Cotecchia S. (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel α_1 -adrenergic receptor subtype. *J.Biol.Chem.* **265**:8183-8189.
- 29.-Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz S, Leung WY, Lefkowitz RF & Caron MG. (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the α_{1a} adrenergic receptor: the gene for which located on human chromosome 5. *J. Biol. Chem* **266**:6365-6369.
- 30.- Perez D, Prasik M, Malik J & Graham RM. (1994) Cloning, Expression, and tissue distribution of the rat homolog of the bovine α_{1a} adrenergic receptor provide for its classification as the α_{1a} subtype. *Mol Pharmacol*. **46**: 823-831.
- 31.- Hieble JP, Clarke D, Langer S, Lefkowitz RJ, Minneman P & Ruffolo Jr. (1995) International Union of Pharmacology X. Recommendation for Nomenclature of α_1 -adrenoreceptors: Consensus Update. *Pharmacological Reviews* **47**: 267-270
- 32.- Garcia- Sánchez JA, Romero - Avila T, Alcntara -Hernández R, Macias- Silva M, Olivares-Reyes A. & González Espinosa C.(1992) Species heterogeneity of hepatic α_1 - adrenoreceptors: α_{1A} , α_{1B} y α_{1C} subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**: 760-767

- 33.- García- Sáinz JA, Romero- Avila T, Olivares-Reyes A & Macías-Silva M.(1992) Guinea pig hepatocyte α_{1A} -adrenoreceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur.J.Pharmacol.* **227**: 239-245
- 34-36.- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab. New York p.3.86-4.5
- 37.- Berry MN, & Friend S. (1969). High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.* **43**: 506-520.
- 38.- Chomczynski P & Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- 39-40.- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab. New York p.6.3-7.4
- 41.- Chuang AM. (1995) Single step product PCR ligation. *Trends Genet.* **11**:7
42. Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab. New York p. 1.86-1.87
- 43.- Ausbel F, Brent R, Kingston R, Seidman JG & Smith J. (1992) *Current Protocols in Molecular Biology* . Harvard Medical School. Vol. 1 sección 7.1.2
- 44.- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab. New York p. 4.21-4.22
- 45.- Ausbel F, Brent R, Kingston R, Seidman JG & Smith J.(1989) *Current Protocols in Molecular Biology* . Harvard Medical School. Vol. 1 sección 7.1.6

- 46.- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab. New York p. 7.10-7.21
- 47.- Darling D& Brickell PM. (1994) *Nucleic Acid Blotting. The Basics*. Oxford University Press. p. 9-25, 29-44.
- 48.- Maniatis T, Sambrook J & Fritsch EF. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Lab. New York p.1.76-1.79
- 49.- Hirasawa A, Horie K, Tanaka T, Murai M & Tsujimoto G. (1987) Cloning, functional expression and tissue distribution of human cDNA for the α_1 -adrenergic receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 902-909
- 50-51.- Farrell RE. (1993) RNA Methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press. p34-54
- 52.- Ostrosky J, Caron MG, Cotecchia S & Letkowitz RJ. (1992) Discrete amino-acid sequences of the alpha-1 adrenergic receptor determine selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J.Biol. Chem* 267: 1633:1639
- 53.- Rana B, Mischooulon D, Xie Y, Bucher N & Farmer S. (1994) Cell-extracellular Matrix can regulate the switch between Growth and Differentiation in rat Hepatocytes : Reciprocal Expression of C/EBP α and immediate-early Growth response Transcription factors. *Mol.Cell.Biol* 14: 5858-5869.
- 54.- Kajiyama Y & Ue M. (1994) Switching from alpha -1 to beta-subtypes in adrenergic response during primary culture of adult-rat hepatocytes as affected by the cell-to-cell interaction through plasma membranes. *Biochem J.* 303:313-321

- 55.-Allen LF, Lefkowitz RJ, Caron MG & Cotecchia S.(1991) G- protein-coupled receptor genes as protooncogenes; constitutively activating mutation of the α_{1b} adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **88**: 11354-11358.
- 56.- Brand T, Sharma H & Shaper W. (1993) Expression of nuclear protooncogenes in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* **25**: 1325-1337
- 57.- Thonberg H, Zhang SJ, Tvrdik P & Jacobson A.(1994) Norepinephrine utilizes α_1 and β adrenoreceptors synergistically to maximally induce *c-fos* expression in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 33179-33186
- 58.- Garcia-Sáinz JA & Alcántara-Hernández R. (1996). $\alpha_1\gamma$ b drenoreceptor activation increases *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. *Pharmacol Commun.* **7**:107-113.
- 59.- Kruijer W, Skelly H, Botteri F, Barber JR, Verma YM & Leffert HL. (1986) Protooncogene expression in regenerating liver is stimulated in cultures of primary adult rat hepatocytes. *J.Biol. Chem.* **261**:7929-7933.
- 60.- Graham RM, Perez D, Hwa J & Piasik TM.(1996) α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes . Molecular Structure, Function , and signaling. *Circ.Res.* **78**: 737-749.
- 61.- GuarinoRD, Perez D & Piasik MT. (1996) Recent advances in the molecular Pharmacology of the α_1 -Adrenergic Receptors. Topical Review. *Cell Signal.* **8**:323-333
- 62.- Schiwin DA, Johnson GI, Pabe SO, Mosley MJ, Wilson KH & Worman NP. (1995) Cloning and pharmacologic characterization of human α_1 -adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparisons with other species homologues. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* **272**:139-142

- 63.- González- Espinosa C & García-Sáinz JA.(1996) Hormonal modulation of *c.fos* expression in isolated hepatocytes. Effects of Angiotensin II and phorbol myristate acetate on transcriptional RNA degradation. *Biochim.Biophys.Acta.* **1310**:217-222
- 64.- González-Espinosa C & García-Sáinz JA (1995). Protein kinases and phosphatases modulate *c-fos* expression in rat hepatocytes. Effects of angiotensin II and phorbol myristate acetate. *Life.Sci.* **56**:723-728
- 65.-Goodman GA, Rall TW, Nies AS & Taylor P. (1990) Goodman and Gilman's, The pharmacological basis of therapeutics. Octava edición. Pergamon . Sección II. Capítulo 10 pp. 187-221.