

163
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION FARMACOLOGICA Y FUNCIONAL DEL RECEPTOR B₂ DE BRADICININA EN FIBROBLASTOS Rat-1 α 1B

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIA ELENA TORRES PADILLA

DIRECTOR DE TESIS

DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ

FACULTAD DE CIENCIAS
1997



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Caracterización farmacológica y funcional del receptor B₂ de bradicinina
en fibroblastos Rat-1_{ad1B}."
realizado por María Elena Torres Padilla
con número de cuenta 9452911-9 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Propietario Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez
Propietario Dra. Claudia González Espinosa
Suplente Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Suplente Dra. María Luisa Fanjul Peña

[Firma]
[Firma]
[Firma]
FACULTAD DE CIENCIAS
[Firma]

Consejo Departamental de Biología
M. en C. Alejandro Martínez Mena

[Firma]



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**A mis padres,
María Elena y Pablo**

A mis hermanos,

María Guadalupe y Juan Pablo

A mis abuelos,

María Elena y Rosa, José Antonio y Guillermo

A Margarita

**A Héctor,
por todo su apoyo**

**A todos mis amigos de la Facultad, especialmente a Valeria, por siempre estar ahí, a Víctor,
Yvonne, Rashidi, Norman y Leo**

**A todos mis compañeros de laboratorio, Rocío Alcántara, Agustín García, Claudia González,
Artemio Mendoza, Patricia Casas, Mario Cruz, Alberto Olivares, María Teresa Romero, Luz del
Carmen Medina, José Vázquez**

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

A México

Un agradecimiento muy especial al Dr. Adolfo García Sáinz por toda la dedicación y atención que prestó a este trabajo y por la transmisión de su valiosa experiencia

Agradezco también al Dr. Luis Vaca del Instituto de Fisiología Celular por haber proporcionado amablemente algunos de los agonistas y antagonistas utilizados en este trabajo.

**Esta tesis fue realizada en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM,
bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz con el apoyo de la
DGAPA IN200596.**

INDICE.**Página**

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	3
	II.1. COMUNICACIÓN CELULAR	3
	II.2. MECANISMOS DE COMUNICACIÓN: VÍAS DE TRANSDUCCIÓN.	6
	II.3. LA BRADICININA Y SU HISTORIA.	15
	II.4. SÍNTESIS Y METABOLISMO.	16
	II.5. MECANISMOS DE ACCIÓN: RECEPTORES A BRADICININA Y VÍAS DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADAS.....	21
	II.5.1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES B ₂	24
	II.5.2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES B ₁	28
	II.6. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.....	29
III.	ANTECEDENTES	31
IV.	OBJETIVOS	33
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	34
VI.	RESULTADOS	37
VII.	DISCUSIÓN	51
VIII.	CONCLUSIONES	57
IX.	INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	58
X.	TABLA DE ABREVIATURAS	59
XI.	LITERATURA CITADA	60
XII.	LITERATURA CONSULTADA	68

I. RESUMEN.

La bradicinina es un mensajero de acción local, sintetizado *de novo* a partir de los kininógenos en sitios donde ha ocurrido daño tisular. En estos sitios participa en las respuestas inflamatorias agudas activando diversos procesos celulares. Además, la bradicinina es reguladora de la presión y el flujo sanguíneos: actúa como agente hipotensor a nivel periférico e hipertensor a nivel central; asimismo, regula las funciones renales y promueve la permeabilidad vascular originando zonas de edema.

La bradicinina ejerce su acción mediante dos tipos de receptores acoplados a proteínas G: el B₂ y el B₁. Estos receptores están acoplados a diferentes vías de transducción dependiendo de la línea celular y la respuesta que inducen, aún dentro de una misma célula, es diversa. Así, por ejemplo, los receptores B₂ están acoplados a la PLC y a la vía de recambio de fosfoinosítidos en células de riñón MDCK, en células de músculo liso DDT1M⁺-2 y en células endoteliales de bovino (Portilla *et al.*, 1988; Gerwins y Freelholm, 1995; Smith *et al.*, 1995); a la PLD en células de músculo liso (Gerwins y Freelhol, 1995), y a la PLA₂ y el metabolismo de ácido araquidónico en fibroblastos Swiss 3T3 y en neuronas de rata (Burch y Axelrod, 1987; Gelperin *et al.*, 1994). Asimismo, inhiben la actividad de la adenilato ciclasa en células musculares de colon e ileon en cuyo (Hasler *et al.*, 1995; Liebman *et al.*, 1995) y promueven la actividad de la MAPK en miocitos (Clerk *et al.*, 1996). La expresión de los receptores de bradicinina también varía dependiendo de la línea celular (Quitterer *et al.*, 1995), por lo que el estudio de la presencia de estos receptores y su función en otras líneas celulares como las Rat-1 cobra importancia.

Con el objeto de determinar los efectos de la bradicinina en las células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1B} , se midieron los cambios provocados por dicha hormona y otros agonistas en la concentración de calcio intracelular y en la producción de fosfatos de [³H]inositol

La bradicinina y la kalidina provocaron un aumento significativo tanto en la concentración de calcio intracelular como en la producción de fosfatos de inositol. Ambos efectos fueron bloqueados completamente por el antagonista selectivo B₂ Hoe 140 por lo que se concluyó que esta línea celular expresa el receptor B₂ y está acoplado al recambio de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio; este acoplamiento ocurre probablemente a través de proteínas tipo G_q y de una fosfolipasa C tipo β.

II. INTRODUCCIÓN.

La transducción de señales comprende todos aquellos procesos que ocurren desde que la célula recibe un estímulo hasta que los efectores logran una respuesta celular; por tanto, constituye una parte integral de los fenómenos de comunicación celular. Los receptores son las moléculas responsables del contacto funcional entre la célula y el exterior. La tesis que a continuación se expone está incluida en el objeto de estudio de la transducción de señales.

II. I. COMUNICACIÓN CELULAR.

La comunicación celular es un proceso indispensable para la integración fisiológica de los organismos multicelulares. Participa en la regulación del desarrollo y la organización de los tejidos, en el crecimiento y la división celulares y en la coordinación de diversas actividades (Alberts *et al.*, 1994). Una célula puede responder a estímulos del medio gracias a la acción de moléculas que transmiten señales, estas moléculas incluyen hormonas, factores de crecimiento peptídicos, neurotransmisores y mediadores hidrofóbicos. Una vez que estos transmisores se unen a los receptores correspondientes, una o más señales intracelulares se generan y alteran el comportamiento de la célula blanco.

Existen tres tipos de comunicación celular de acuerdo con la distancia que recorren los mensajeros antes de alcanzar su blanco: endocrina, paracrina y autocrina (Fig. 1). La primera ocurre por medio de la liberación de hormonas que recorren grandes distancias dentro del organismo; en la segunda, el mensajero actúa solamente sobre un conjunto de células contiguas; finalmente, en la comunicación autocrina las células responden a sustancias que liberan ellas mismas (Darnell *et al.*, 1993).

Las células utilizan diversos mecanismos para comunicarse, entre ellos: (a) mediante la

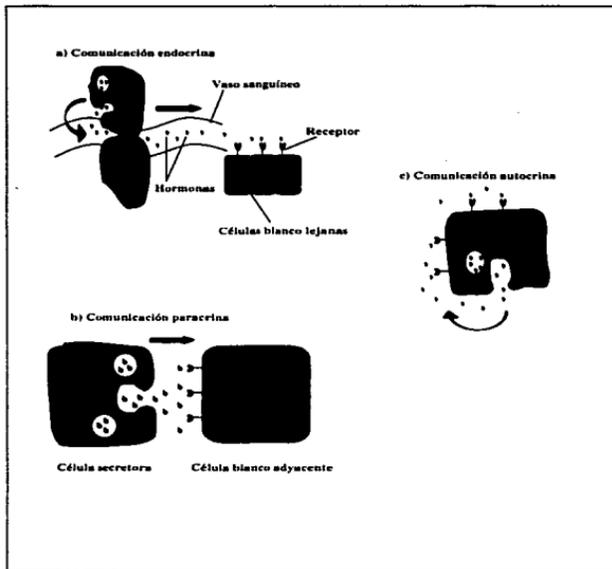


Fig. 1. Tipos de comunicación celular de acuerdo con la distancia que recorre el mensajero. La comunicación endocrina (a) requiere que haya transporte de la hormona a través de la sangre, por lo que cubre blancos distantes. La comunicación a nivel local se conoce como paracrina (b), los mensajeros suelen tener vida media corta. La comunicación autocrina (c) está implicada en la autorregulación de la célula, es decir, ésta responde a estímulos producidos por ella misma.

secreción de sustancias químicas dirigidas a otras células que se encuentran a cierta distancia.

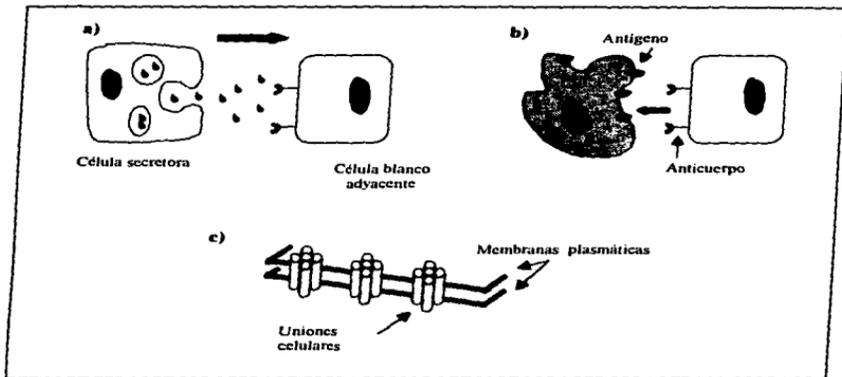


Fig. 2. Mecanismos de comunicación celular. La comunicación celular puede darse de varias formas: a) mediante la secreción de sustancias químicas dirigidas a otras células; b) por medio de moléculas unidas a la membrana plasmática, tal es el caso de los anticuerpos y los antígenos, y c) por medio de uniones celulares que mantienen en contacto los citoplasmas (uniones tipo 'gap').

(b) por medio de moléculas unidas a la membrana plasmática que influyen sobre otras células al hacer contacto físico con ellas y (c) mediante la formación de uniones celulares - tipo *gap* - que mantienen en contacto los citoplasmas (Alberts *et al*, 1994; Fig. 2).

Las hormonas pertenecen a uno de los tres grupos de sustancias que pueden ser secretadas por las células y se caracterizan porque su distribución en el organismo es amplia gracias a que son

transportadas a través de la corriente sanguínea, por lo que actúan sobre un gran número de células. Los otros dos grupos los constituyen, por un lado, sustancias que tienen un efecto local debido a que son rápidamente degradadas y, por otro, neurotransmisores, que actúan sólo sobre la célula adyacente (Alberts *et al.*, 1994).

Los mensajeros hormonales pueden ser de varios tipos de acuerdo a su constitución química: proteínas y glucoproteínas, péptidos pequeños, derivados aminoácidos y esteroides (Tabla 1).

II. 2. MECANISMOS DE COMUNICACIÓN: VÍAS DE TRANSDUCCIÓN.

Se denomina transducción a la serie de procesos que ocurren desde el momento de la interacción del mensajero con la célula hasta la producción de las acciones o efectos específicos celulares. Las vías de transducción son variadas y constan de varios elementos: los receptores, los acopladores, los efectores y los segundos mensajeros. Existen vías de transducción en las que sólo participan algunos de estos elementos.

Los receptores son proteínas que confieren a la célula la capacidad para responder a una señal extracelular específica. Hay receptores de membrana e intracelulares. Los receptores se unen a los mensajeros químicos liberados por otras células. En consecuencia, llevan a cabo un cambio funcional que provoca una secuencia de eventos biofísicos y bioquímicos que conducen a un efecto sobre la secreción, la contracción, el metabolismo o el crecimiento. La interacción entre el ligando y el receptor se lleva a cabo en dos fases, la primera o de ocupación ocurre cuando el ligando se une con el receptor y la segunda o de activación es el cambio funcional que dicha unión provoca en el receptor.

Una molécula acopladora es aquella encargada de relacionar al receptor y a las moléculas

HORMONAS	ORIGEN	EFFECTOS
a. Peptídicas		
Insulina	Pancreas	Metabolismo de carbohidratos
Somatotropina	Hipofisis anterior	Crecimiento de musculos y huesos; diferenciación celular
Adrenocorticotrófica (ACTH)	Hipofisis anterior	Producción de cortisol; liberación de acidos grasos en células adiposas
Parathormona	Paratiroides	Aumento de la reabsorción ósea, disminución de la reabsorción fosfato en los tubulos renales
Estimuladora del folículo (FSH)	Hipofisis anterior	Estimulación de folículos ováricos y de la espermatogenesis
Luteinizante (LH)	Hipofisis anterior	Maduración del ovocito, secreción de progesterona y testosterona
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Desconocido	División de células epidérmicas
Estimuladora de la tiroides (TSH)	Hipofisis anterior	Producción de hormonas tiroideas, liberación de acidos grasos de células adiposas
b. Péptidos pequeños		
Factor de liberación de TSH	Hipotálamo	Secreción de TSH
Liberadora de LH	Hipotálamo	Liberación de LH
Vasopresina	Hipofisis posterior	Regulación del volumen sanguíneo y equilibrio hídrico del riñón
Somatostatina	Hipotálamo	Inhibición de la liberación de somatotropina
c. Derivados de aminoácidos		
Epinefrina	Medula adrenal	Glucogenólisis de hígado y músculo; incremento de la presión sanguínea; liberación de acidos grasos de adipocitos
Tiroxina	Tiroides	Incrementa la actividad metabólica
d. Esteroides		
Cortisol	Corteza suprarrenal	Metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos
Estradiol	Ovario, placenta	Caracteres sexuales secundarios, función de órganos sexuales accesorios, desarrollo de glándulas mamarias
Testosterona	Testículo	Caracteres sexuales secundarios, función de los órganos sexuales accesorios
Progesterona	Cuerpo lúteo, placenta	Mantenimiento y preparación del embarazo, desarrollo del sistema alveolar en las glándulas mamarias

Tabla 1. Hormonas, lugar de origen y sus efectos

efectoras, es decir, permite el paso de información del receptor hacia los efectores celulares. Las proteínas G son moléculas acopladoras por excelencia, son encargadas de conducir el mensaje desde el receptor hacia varios tipos de enzimas entre las que figuran la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C.

Las moléculas efectoras son activadas por las moléculas transductoras, son enzimas que actúan sobre un sustrato para producir segundos mensajeros; también se consideran como efectores algunos canales iónicos cuya permeabilidad se modifica bajo la acción de algunas proteínas G.

Los segundos mensajeros son producto de la activación de las moléculas efectoras y actúan, a su vez, como efectores alostéricos capaces de modular la actividad de proteínas específicas que convierten una serie de sustratos en terceros mensajeros y así sucesivamente. Así pues, la regulación de las concentraciones de estos mensajeros constituye una parte indispensable del mecanismo de transducción.

Todos estos elementos participan en el proceso de comunicación intercelular, una manera de enumerar los sucesos que ocurren en éste es la siguiente:

1. Una célula emisora manda un mensaje mediante la secreción de sustancias químicas.
2. Estas moléculas emitidas son captadas en la célula blanco por una molécula receptora específica que puede encontrarse en su superficie o en el citosol y a la que se unen con gran afinidad.
3. Los receptores sufren un cambio conformacional.
4. Dicho cambio conformacional permite a los receptores la interacción con una serie de moléculas acopladoras.
5. Esta interacción activa a las moléculas acopladoras que, a su vez, actúan sobre moléculas efectoras que producirán segundos mensajeros.
6. Los segundos mensajeros conducen a la activación de moléculas como enzimas o factores de

transcripción originando la respuesta celular al estímulo.

De acuerdo con el tipo de receptores, transductores, segundos mensajeros y efectores y con las interacciones que entre ellos ocurran, se determinará la naturaleza de la respuesta. Estas interacciones son las responsables de interpretar correctamente el mensaje.

Así pues, se han distinguido varias vías de transducción de acuerdo con el tipo de moléculas transductoras y efectoras involucradas. Los más comunes se resumen de la siguiente manera:

1. *Mecanismos de transducción en los que el receptor está acoplado a proteínas G.* Esta vía consta de receptores, acopladores, efectores y segundos mensajeros. Aquí, una proteína G funciona como adaptador y amplificador encargado de activar o inhibir una enzima que cataliza la producción de un mediador intracelular soluble que, en sí mismo, constituye una señal.

La unión de la hormona con el receptor provoca un cambio en la conformación de éste, dicho cambio, a su vez, lo capacita para unirse y activar a la proteína G. Las proteínas G constan de tres subunidades: α , β y γ . La activación de la proteína requiere del recambio de GDP por GTP en la subunidad α , este proceso cambia la conformación de la proteína de tal manera que el dímero $\beta\gamma$ - el otro constituyente de la proteína G- se libera y tanto la subunidad α como el dímero $\beta\gamma$ pueden modular la actividad de efectores. Finalmente, la propia proteína G_{α} se inactiva hidrolizando el GTP en GDP con la consecuente liberación de fosfato (P_i) y se reasocia a las subunidades β y γ (Alberts *et al.*, 1994). Los efectores pueden ser enzimas como adenilato ciclasa, fosfolipasas A, C y D, canales iónicos específicos para calcio, potasio o sodio y proteínas de transporte (Hardman y Limbird, 1996).

En la Figura 3 se esquematiza una vía de transducción en la que el receptor está acoplado a

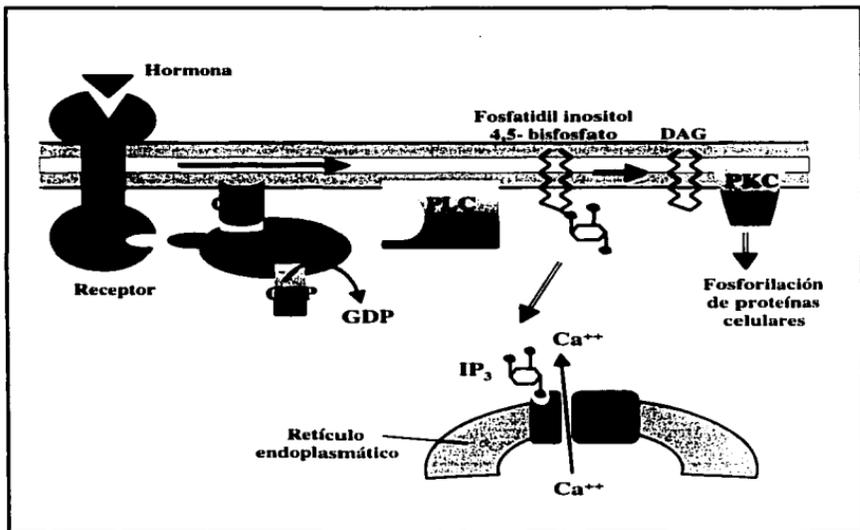


Fig. 3. Ejemplo de un mecanismo de transducción en el que el receptor está acoplado a proteínas G. El receptor es estimulado por la hormona y sufre un cambio de conformación que le permite unirse a la proteína G; la subunidad α (G_α) está unida a una molécula de GDP; al activarse, se sustituye éste por una molécula de GTP. G_α se disocia de las subunidades $\beta\gamma$ y tanto la primera como el complejo son capaces de activar efectores. En este caso, G_α activa a la enzima efectora: la fosfolipasa C (PLC). La proteína G se inactiva a sí misma al convertir el GTP en GDP + Pi y reasociar las subunidades $\beta\gamma$ con G_α . La PLC actúa sobre un fosfolípido de membrana y libera 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3). El DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) y el IP_3 provoca la movilización de calcio del retículo endoplasmático.

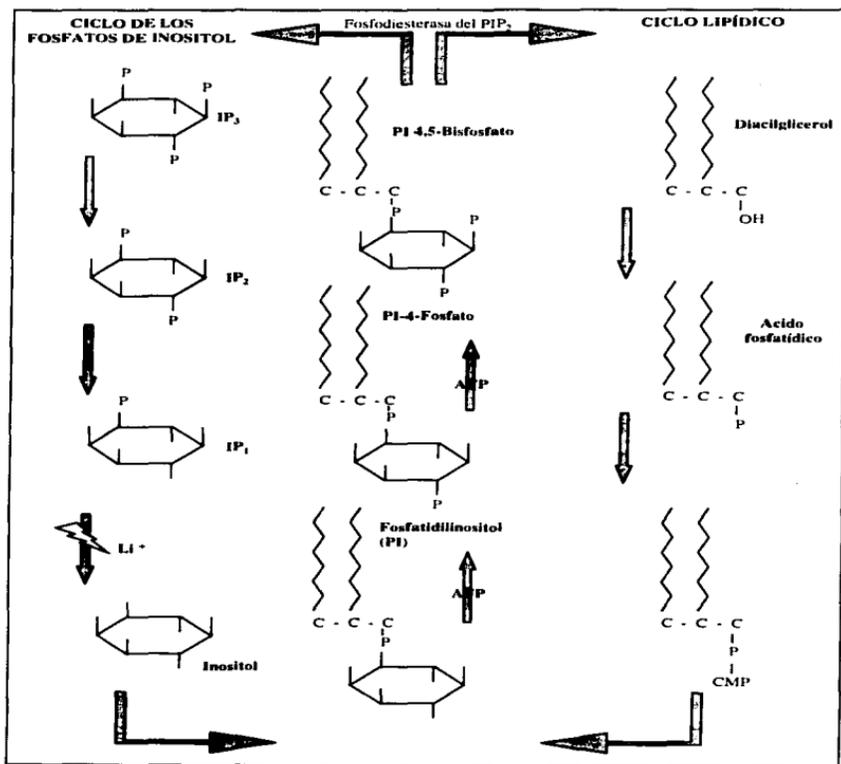


Fig. 4. Ciclo de los fosfatos de inositol y del diacilglicerol.

la fosfolipasa C mediante una proteína G. La fosfolipasa C activa la vía de recambio de fosfoinosítidos mediante la hidrólisis de una molécula de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) que resulta en la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG); esta vía tiene como efecto el aumento en la concentración de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Figs. 3 y 4). Por su parte, el calcio puede unirse a la calmodulina, la cual regula la función de un gran número de enzimas, entre ellas, algunas fosfodiesterasas y adenilato ciclasas, ATPasas de calcio, así como de la fosforilasa y la cinasa de la cadena ligera de la miosina (Alberts *et al.*, 1994).

En los casos donde la proteína G está acoplada a la adenilato ciclasa, se produce AMP cíclico; este nucleótido constituye un segundo mensajero de gran relevancia responsable de activar otras proteínas como la proteína cinasa A (PKA).

Se han encontrado varios tipos de proteínas G que, según se acoplen a los receptores, determinan el efecto de un ligando sobre un tipo celular. Así, por ejemplo, la proteína G_s activa a la adenilato ciclasa, la G_i inhibe a la adenilato ciclasa y abre canales de potasio, la G_q está acoplada a la fosfolipasa C, la G₁₂ a la fosfodiesterasa del GMP cíclico (Linder y Gilman, 1992). Algunas de estas proteínas G se identifican debido a que pueden ser inactivadas por la toxina de la bacteria *Bordetella pertussis*.

Los receptores que están acoplados a las proteínas G constituyen un grupo muy importante que comparte ciertas características en común. Estos receptores conforman una superfamilia de proteínas de membrana caracterizados por tener siete dominios transmembranales hidrofóbicos, cada uno de ellos constituido por veinte a veinticinco aminoácidos, que suelen formar, al conjuntarse, un sitio de unión al ligando en forma de bolsa. Dichas proteínas son específicas y juegan un papel fundamental en la transmisión de señales mediante la interacción con proteínas G heterotriméricas. Responden a una gran diversidad de agentes tales como análogos lipídicos, derivados aminoácidos,

péptidos pequeños y estímulos como la luz o el olor.

Los dominios transmembranales presentan la estructura de α -hélice; los extremos del receptor pueden tener una longitud variable; el extremo amino es extracelular y juega un papel importante en la unión de algunos ligandos, mientras que el carboxilo terminal es intracelular y es importante en la interacción con la proteína G.

Los receptores acoplados a proteínas G pueden ser glucosilados, palmitoilados y fosforilados. La glucosilación ocurre en residuos de asparagina situados en secuencias consenso y determina la distribución del receptor en la membrana celular; la palmitoilación está asociada con el acoplamiento a la proteína G, y la fosforilación ocurre en residuos intracelulares de serina y treonina por actividad de PKA o PKC y está implicada en la desensibilización del receptor.

2. Mecanismos de transducción en los que el receptor presenta actividad de cinasa. Esta vía no presenta acopladores ni segundos mensajeros. En estos casos, el receptor es, en sí, una proteína cinasa que se activa mediante la unión del ligando y transfiere un grupo fosfato desde la posición y del ATP hacia residuos de tirosina, serina o treonina de proteínas celulares específicas, incluyendo el receptor mismo y proteínas membranales y/o citosólicas. La fosforilación y desfosforilación son las que regulan la actividad de las proteínas efectoras.

3. Mecanismos de transducción en los que el receptor presenta alguna otra actividad enzimática. Además de los receptores con actividad de cinasa existen otros receptores cuyo dominio intracelular tiene actividad de guanilato ciclasa y es capaz de sintetizar GMP cíclico como segundo mensajero. Este nucleótido es un mediador intracelular que puede modular las respuestas celulares y activar proteínas cinasas dependientes de GMPc como la proteína cinasa G.

El receptor del factor natriurético auricular (ANF) es un buen ejemplo de este tipo de receptores

Además, existen otras proteínas con dominios de unión extracelulares al ligando que tienen actividad de fosfatasa (Hardman y Limbird, 1996).

4. *Mecanismos de transducción en los que el receptor es un canal iónico.* El receptor en sí forma un canal regulado por el ligando. El receptor consta de varias subunidades que se unen para dar forma al canal. En esta vía no hay proteínas acopladoras. En células con propiedades eléctricas, como las neuronas y las células musculares, el flujo de iones a través de estos receptores provoca cambios en las propiedades eléctricas de las membranas: la diferencia de potencial a través de la membrana se modifica y origina una respuesta celular. Por otra parte, si la entrada de iones es mayor puede iniciarse una respuesta intracelular de otra índole debido a la alteración en la composición citosólica de iones como el calcio que pueden actuar como segundos mensajeros que y desencadenar diversos procesos (Hardman y Limbird, 1996).

La intercomunicación de vías de transducción que en un principio se creían independientes es un fenómeno común. La intercomunicación de estas vías ocurre mediante la acción de proteínas como cinasas (MAPK, PKC, PKA), fosfatasas (1, 2A) o segundos mensajeros (AMPc, GMPc, DAG, calcio). Algunos ejemplos son la fosforilación de los receptores α_2 adrenérgicos por la PKC (Houslay, 1991) y de los receptores β adrenérgicos por la cinasa de tirosina del receptor de insulina (Baltensperger *et al.*, 1996).

Las vías de transducción de la bradicinina están también intercomunicadas con vías activadas por otros receptores. Por ejemplo, en neuronas de rata, la bradicinina ejerce cierto efecto

antagónico sobre los receptores adrenérgicos α_2 provocando un incremento en la IC_{50} de la norepinefrina (Fior y Fuxe, 1995). Asimismo, la estimulación del receptor B_2 en queratinocitos induce la fosforilación en tirosina, dependiente de PKC, del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) estableciendo así, un vínculo entre la activación de un receptor acoplado a proteína G (B_2) y la modulación del nivel de fosforilación de un receptor para un factor de crecimiento (Coutant *et al.*, 1995). En las células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1B} , la endotelina-1 provoca un incremento en la fosforilación de dicho receptor (Vázquez-Prado *et al.*, 1997).

II. 3. LA BRADICININA Y SU HISTORIA.

En 1909 Abelous y Bardier observaron un efecto hipotensor en el hombre, resultado de la inyección vía intravenosa de extractos de orina humana. Los trabajos de Frey, Werle y Kraut condujeron, primero, al descubrimiento del mismo principio activo en el páncreas humano: la kalikreina; posteriormente definieron a la kalikreina como una enzima que incrementa su actividad al ser incubada con el plasma, con el cual reacciona y da origen a una molécula más pequeña: la kalidina. Años más tarde Rocha e Silva y cols. reportaron que la incubación de la sangre con tripsina liberaba una sustancia que provocaba una disminución en la presión sanguínea y una contracción lenta en el intestino del cuyo. Este mismo grupo nombró al nuevo agente como *bradicinina*, lo purificó y determinó su carácter peptídico. El estudio de los efectos de la bradicinina se ha intensificado en las últimas dos décadas gracias al desarrollo de antagonistas específicos de sus receptores. Cabe introducir aquí los conceptos de agonista y antagonista. Los agonistas son fármacos que se unen a receptores fisiológicos y mimetizan los efectos de compuestos reguladores

endógenos. Por su parte, los antagonistas son sustancias capaces de unirse a los receptores pero no mimetizan los efectos de los agonistas sino los bloquean.

Las cininas conforman un grupo de polipéptidos con estructura química y propiedades farmacológicas similares. De ellas, las más importantes son la bradiginina (BK), la lisil-bradiginina o kalidina (Lys-BK), la metionil-lisil-bradiginina (Met-Lys-BK) y sus respectivos metabolitos, y son conocidas como cininas plasmáticas. Otras cininas con funciones fisiológicas importantes son las leucocininas, las colostrocininas y las neurocininas (Regoli y Barabé, 1980).

II. 4. SÍNTESIS Y METABOLISMO.

La bradiginina (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) se considera una hormona de acción local (Rocha e Silva *et al.*, 1970) y, al igual que la kalidina, se origina de la degradación de los kininógenos, globulinas α_2 que son sintetizadas por el hígado y circulan en el plasma. Existen dos tipos de kininógenos, los de alto peso molecular (HMWK) y los de bajo peso molecular (LMWK). Los primeros son el sustrato de las kalikreinas plasmáticas, mientras que los segundos lo son de las kalikreinas urinarias y tisulares (Regoli y Barabé, 1980).

Las kalikreinas son proteasas de serina que circulan en el plasma en estado inactivo y que requieren de otras proteasas para activarse. Las prekalikreinas plasmáticas son sintetizadas por el hígado y son almacenadas en el páncreas, intestino y riñón; después de ser secretadas son activadas por proteólisis por el factor de coagulación XII, conocido también como factor Hageman (Fig. 5). Las kalikreinas tisulares actúan sólo cerca de su lugar de origen, el cual puede ser las glándulas

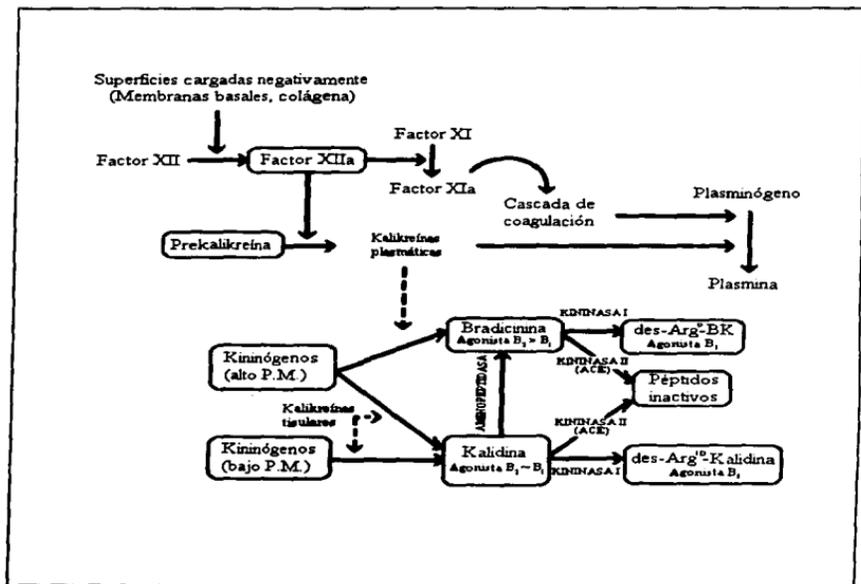


Fig. 5. Diagrama esquemático de la producción y destrucción de las cininas. La bradicina y kalidina (Lys-Bradicina) se forman a partir de los kininógenos mediante la acción de las kalikreínas. Existen kalikreínas plasmáticas y tisulares, las primeras conducen a la formación de bradicina mientras que las segundas a la de kalidina. La formación de las cininas se origina con la actividad del Factor de Hageman, componente de la cascada de coagulación. La cininasa I convierte estas dos hormonas en metabolitos des-Arg que constituyen agonistas B₁; la cininasa II o ACE (del inglés *angiotensin-converting enzyme*) las inactiva.

salivales, el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular (Hardman y Limbird, 1996).

La secuencia de nueve aminoácidos que constituyen la bradicinina se encuentra uniendo la cadena pesada amino terminal con la cadena ligera carboxilo terminal de los kininógenos. Las kalikreinas tisulares y plasmáticas cortan dicha secuencia en los kininógenos de alto peso molecular para dar lugar a la kalidina y a la bradicinina, respectivamente.

Las cininas plasmáticas y aún aquellas que difunden a través de las paredes capilares o de los vasos linfáticos son inactivadas rápidamente por varias enzimas (Fig. 6); la vida media de la bradicinina en el plasma es de aproximadamente quince segundos mientras que la de la kalidina es de diecinueve segundos (Regoli y Barabé, 1980). La bradicinina es, por lo tanto, inactivada más rápidamente que la kalidina y otras cininas naturales.

Las proteasas que actúan sobre el extremo amino terminal de las cininas no tienen un papel sustancial en la inactivación de las mismas. Las cininasas I y II son metaloproteínas que tienen diferentes sitios de acción; la primera se encuentra en la sangre mientras que la segunda se localiza principalmente en la membrana de las células endoteliales del pulmón y de otros órganos vasculares, el cerebro, el riñón y los testículos.

La cininasa I es la responsable de la destrucción del 90% de las cininas en el plasma; esta enzima remueve un grupo arginino terminal liberando dos potentes agonistas B₁: la des-Arg⁹-BK y la des-Arg¹⁰-KD (Tabla 2). La cininasa II desactiva las cininas en su paso por el pulmón; se trata de la misma carboxidipeptidasa que transforma a la angiotensina I en angiotensina II (enzima convertidora de angiotensina o ACE) y los metabolitos resultantes de su actividad son inactivos (Regoli y Barabé, 1980). Otras endopeptidasas de tejidos específicos también pueden producir péptidos inactivos (Dray y Perkins, 1993).

La concentración de las cininas en la sangre es muy baja, siendo el resultado del balance entre

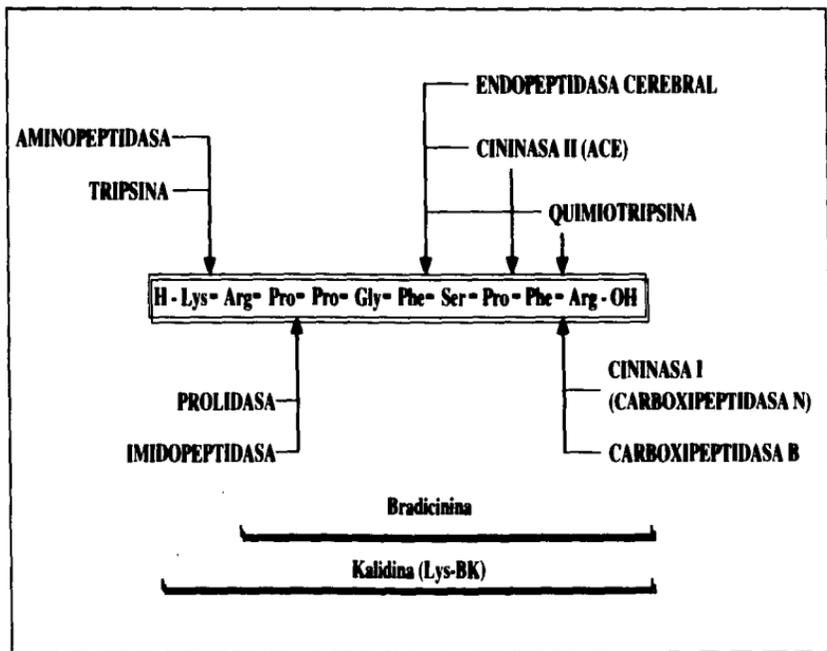


Fig. 6. Estructura primaria de la bradicinina y kalidina. Sitios de acción de las enzimas proteolíticas. Las enzimas que actúan sobre el extremo amino no tienen un papel sustancial en la desactivación de estos péptidos. La cininasa I es responsable de la degradación de las cininas en el plasma y la cininasa II o ACE (del inglés angiotensin converting enzyme) desactiva las cininas en su paso por el pulmón.

procesos simultáneos de producción e inactivación. Los kininógenos, por el contrario, se encuentran en mucho mayor concentración (4 a 12 mg/ml de sangre) y solamente es necesario degradar una pequeña cantidad de ellos para provocar un aumento considerable en la concentración de cininas plasmáticas que normalmente se encuentran en concentraciones del rango de ng/ml (Revisado en Regoli y Barabé, 1980).

Durante los procesos inflamatorios subcutáneos la bradisinina alcanza concentraciones locales de hasta 1 nM (Joris *et al*, 1987); este mensajero se libera como resultado de daño tisular, anoxia o disminución del pH, provocando dolor, inflamación y vasodilatación, así como aumento de la permeabilidad vascular. En consecuencia, la concentración de las cininas se incrementa con algunos padecimientos; así por ejemplo, es mayor en las secreciones nasales de pacientes alérgicos y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Revisado en Regoli y Barabé, 1980; Steranka y Burch, 1991; Hall, 1992).

Las acciones de las cininas son variadas. Han sido asociadas con la regulación del sistema cardiovascular, en donde, al ser aplicadas periféricamente, tienen un efecto hipotensor marcado debido a su acción vasodilatadora; no obstante, la bradisinina aplicada de manera central es hipertensora. Estos efectos son resultado de la inhibición de la contracción muscular provocada por la acción de las prostaglandinas. La bradisinina estimula la producción de óxido nítrico, agente vasodilatador, en las células de los vasos cuyo endotelio ha sido dañado (Dray y Perkins, 1993).

Las cininas favorecen la liberación de prostaglandinas, responsables del efecto algésico y de la modificación de las funciones renales provocadas por la bradisinina (Regoli y Barabé, 1980).

La bradisinina es capaz de liberar catecolaminas de la médula suprarrenal; tiene efectos quimiotácticos y estimulantes en macrófagos y neutrófilos y provoca la degranulación de células cebadas (Dray y Perkins, 1993).

El aumento del flujo sanguíneo hacia los tejidos, característico de los procesos inflamatorios, se logra mediante un incremento en la presión sanguínea al reducir la resistencia arteriolar, y es facilitado por el aumento en la permeabilidad capilar, resultado de la separación de las uniones herméticas entre las células endoteliales (Fig. 7).

Las acciones principales de las cininas se resumen en la regulación del flujo de sangre periférica y en la defensa fisiológica de los tejidos contra estímulos dañinos.

Las kalikreinas y cininas también han sido implicadas en la regulación del tono del músculo liso, en el control de la motilidad del espermatozoide, en la proliferación celular y en el cambio de la circulación sanguínea del neonato (revisado por Regoli y Barabé, 1980).

II. 5. MECANISMOS DE ACCIÓN: RECEPTORES A BRADICININA Y VÍAS DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADAS.

Los efectos producidos por la bradicinina son el resultado de la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G, de los cuales se describieron originalmente dos tipos: B₂ y B₁ (Regoli y Barabé, 1980). Se descubrió primero el receptor B₁ en preparaciones de aorta de conejo; sin embargo, el receptor que ha sido más estudiado es el receptor B₂. Estudios con antagonistas B₂ (análogos de bradicinina sustituidos en [D-Phe⁷]), llevados a cabo en tejido muscular liso de la tráquea de cuyo, proveen cierta evidencia de la existencia de un tercer tipo de receptor, el tipo B₃ (Farmer *et al.*, 1989). Sin embargo, dichos análogos tienen poca afinidad con los receptores B₂ y no se ha establecido claramente si se trata o no de otro tipo de receptor.

Los receptores B₂ median muchas de las acciones de la bradicinina, se expresan constitutivamente en la mayoría de los tejidos de rata, humano, cuyo y conejo, mientras que los

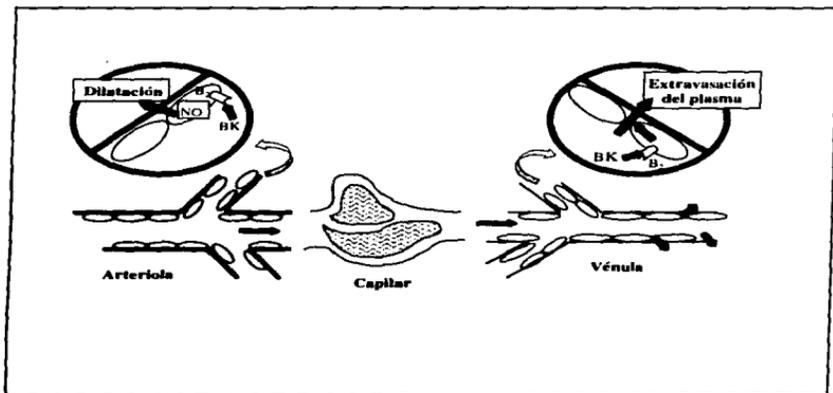


Fig. 7. Efectos proinflamatorios de los receptores de bradicinina en la microvasculatura. Las cininas se producen en sitios donde ha ocurrido daño tisular; aquí son capaces de activar a los receptores B₂ de las células endoteliales que liberan óxido nítrico resultando en la vasodilatación arteriolar y en el incremento del flujo sanguíneo. En las vénulas postcapilares incrementan la permeabilidad vascular provocando la extravasación plasmática.

receptores B₁ se expresan en menor grado. Estos últimos están presentes normalmente en el músculo liso vascular, en donde su activación resulta en hipotensión. En células cebadas, macrófagos y endotelios la síntesis de receptores B₁ aumenta progresivamente durante los procesos inflamatorios o como resultado de daño tisular y trauma (Regoli y Barabé, 1980).

Agonistas B₂:	Kalidina ≥ [Tyr(Me) ⁸]-BK ≥ Bradicinina > desArg ¹⁰ -KD > desArg ⁹ -BK
Agonistas B₁:	desArg ¹⁰ -KD > desArg ⁹ -BK > Kalidina > Bradicinina > [Tyr(Me) ⁸]-BK

Tabla 2. Farmacología típica de los receptores B₂ y B₁. Los agonistas se mencionan por orden de potencia: (BK = bradicinina, KD = kalidina)

NOMBRE	ESTRUCTURA PRIMARIA	ACCIÓN
Hoc 140	[D-Arg]- Arg - Pro - Hyp - Gly - Thi - Ser - [D-Tic]- Oic - Arg	B ₁
B4146	[D-Arg]- Hyp - Pro - Gly - Thi - Ser - [D-Pro]- Thi - Arg	B ₁
Na-d[H,T,P]	CH ₂ - [D-Arg]- Arg - Pro - Hyp - Gly - Thi - Ser - [D-Phe]- Thi - Arg	B ₂
d [H, T, P]	[D-Arg]- Arg - Pro - Hyp - Gly - Thi - Ser - [D-Phe]- Thi - Arg	B ₂
des-Arg ⁹ ,Leu ⁸ -BK	Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser -Pro - Leu	B ₁
des-Arg ¹⁰ ,Leu ⁸ -KD	Lys - Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser -Pro - Leu	B ₁
des-Arg ¹⁰ -Hoc 140	[D-Arg]- Arg - Pro - Hyp - Gly - Thi - Ser - [D-Tic]- Oic	B ₁
WIN 64338	No peptidico	B ₁

Tabla 3. Estructura primaria de los antagonistas de los receptores de bradicinina. D-Tic y Oic representan dos aminoácidos artificiales: ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y ácido [3aS,7aS]-octahidroindol-2-carboxílico, respectivamente; Thi es L-[3-(2-tienil)alanil]. BK = Bradicinina, KD = Kalidina.

II. 5. 1. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES B₂.

Este receptor consta de 364 aminoácidos y tiene un peso molecular de 42kDa; presenta un enlace disulfuro (Cys103-Cys184), probables sitios de fosforilación por PKA (Ser316) y por PKC (Thr170, Thr237 y Thr342) y de glucosilación (Asn3, Asn12 y Asn180) (Fig. 8) (Revisado por Watson y Arkinstall, 1994). La glucosilación del receptor ocurre en tres sitios, provoca un aumento de su peso molecular hasta 78-81 kDa y no tiene ningún efecto en las interacciones receptor-ligando sino en la estabilización del receptor para permanecer en la membrana (Yaqoob *et al.*, 1995).

El receptor humano está codificado por un gen único que consta de tres exones (Kammerer *et al.*, 1995). En la rata, el número de exones es de cuatro y el tercero es procesado alternativamente originando el mismo tipo de receptor (Pesquero *et al.*, 1994).

Los receptores B₂ presentan diferencias genéticas entre especies como el cuyo y el conejo (Regoli y Gobeil, 1995), con base en las diferencias de actividad de agonistas y antagonistas se han identificado como dos subtipos del receptor B₂: el B_{2_h} en conejo y el B_{2_q} en cuyo (Regoli *et al.*, 1995).

El receptor B₂ activa el metabolismo de fosfoinosítidos vía proteínas G_q/G₁₁ insensibles a toxina pertussis e inhibe la actividad de la adenilato ciclasa mediante su interacción con una proteína G sensible a toxina pertussis; asimismo, su activación provoca la elevación de los niveles de GMP cíclico y la apertura de canales iónicos (Resumido en Watson y Arkinstall, 1994).

Los receptores B₂ están acoplados a diversas vías transduccionales de acuerdo con el tipo celular. Estos receptores activan a la PLA₂, a la PLC y a la PLD (Burch y Axelrod, 1987; Portilla *et al.*, 1988; Blitterswijk *et al.*, 1991; Pyne y Pyne, 1994). La PLA₂ cataliza la producción de ácido araquidónico a partir de la fosfatidilcolina y la consecuente secreción de prostaglandinas E₂ e I₂ que,

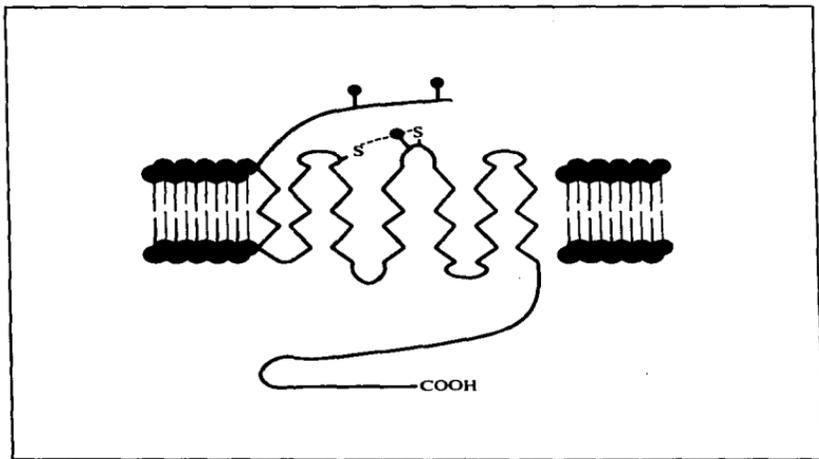


Fig 8. Representación esquemática del receptor B₂.
Se indican los sitios de N - glucosilación (●) y el enlace disulfuro entre la primera y segunda asas extracelulares.

a su vez, pueden activar a la adenilato ciclasa (Bareis *et al*, 1983); por su parte, la PLC es activada, en células de riñón, por medio de una proteína G_i sensible a toxina pertussis (Portilla *et al*, 1988), en consecuencia, la vía de recambio de fosfoinosítidos se activa y tiene como efecto el aumento de la concentración de calcio intracelular y la activación de la PKC. La bradicinina es capaz de activar varias isoformas de la PKC, incluyendo las dependientes e independientes de calcio, así como algunas isoformas atípicas (Tippmer *et al*, 1994). La acción de una proteína G insensible a toxina pertussis (G_q o G₁₁) sobre la PKC conduce a la excitación de neuronas simpáticas mediante la inhibición de una corriente de potasio de tipo M (Jones *et al*, 1995).

Se ha reportado la producción de calcio como segundo mensajero resultado de la activación del receptor B₂ en varias líneas celulares (Bareis *et al*, 1983; Issandou *et al*, 1991; Quitterer *et al*, 1995; AbdAlla *et al*, 1996). El calcio es importante modulador del efecto de la bradicinina sobre la contracción muscular (Butl *et al*, 1995; Hasler *et al*, 1995); de hecho, la contracción muscular es un parámetro utilizado frecuentemente para determinar el efecto de la bradicinina o de la des-Arg⁹-BK en preparaciones tisulares. Asimismo, la movilización de calcio producida por la bradicinina se ha usado como modelo para estudiar los cambios en la concentración de calcio intracelular: la movilización de compartimentos celulares, la depleción de pozas intracelulares, la entrada de iones y la actividad de las bombas de calcio (Quitterer *et al*, 1995; AbdAlla *et al*, 1996).

Las prostaglandinas son mediadores fundamentales del efecto de la bradicinina, éstas se generan a partir de araquidonato que puede originarse mediante la vía de la PLA₂ o mediante la acción de lipasas de diglicéridos activadas en la vía de la PLC (Bareis *et al*, 1983; Burch y Axelrod, 1987). La PLA₂ activa, a su vez, a la lipoxigenasa, la cual produce un incremento en la

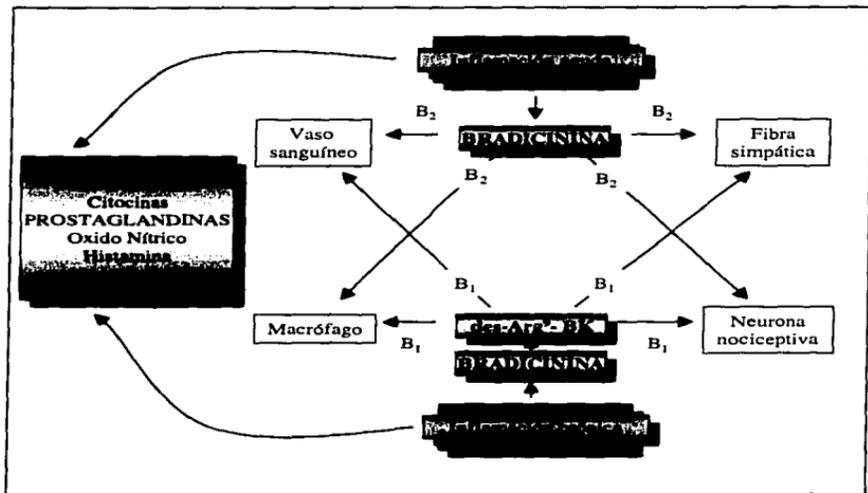


Fig. 9. Efectos producidos por la bradicina durante los procesos inflamatorios. La bradicina activa directamente neuronas nociceptivas vía receptores B_2 y estimula la producción de una gran variedad de mediadores incluyendo prostaglandinas a partir de varios tipos celulares como fibras simpáticas; citocinas a partir de macrófagos; óxido nítrico de macrófagos y endotelios vasculares; histamina resultado de la degranulación de células cebadas, y neuropeptidos de fibras aferentes. Durante la inflamación crónica, la sensibilidad a la des-Arg⁹-BK aumenta y los receptores B_1 juegan un papel muy importante en la hiperalgesia, que es provocada por la acción de las prostaglandinas y la activación de fibras simpáticas.

concentración intracelular de GMPc (Snider y Richelson, 1984).

La bradicinina también activa, en células ventriculares, a la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) a través de la acción de la PKC (Clerk *et al.*, 1996).

II. 5. 2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES B₁.

La inducción de los receptores B₁ durante los procesos inflamatorios es resultado de la respuesta local a metabolitos de las cininas que normalmente son inactivos. Estos receptores median las acciones de las cininas en algunas hiperalgesias y en el control de la presión sanguínea. Se ha identificado el gen que codifica para este receptor; la secuencia de aminoácidos guarda una similitud del 36% con el receptor B₂ (Menke *et al.*, 1994, Revisado en Hall, 1997).

Las vías de transducción activadas por estos receptores no han sido muy estudiadas. Hay algunos reportes que indican que la activación del receptor B₁ conduce a la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico en células epiteliales, probablemente mediante la acción de la PLA₂. (Sung *et al.*, 1988). La activación de estos receptores provoca la contracción del músculo liso mediante la hidrólisis del fosfatidilinositol en vejiga urinaria de conejo (Butt *et al.*, 1995). La estimulación de los receptores B₁ provoca la activación de la PLC en cultivos primarios de algunos tejidos (Issandou y Darbon, 1991; Tropea *et al.*, 1993).

II. 6. RECEPTORES ADRENÉRGICOS.

El conocimiento sobre los receptores adrenérgicos es muy amplio. La epinefrina (adrenalina) y norepinefrina (noradrenalina) se descubrieron hace ya más de 100 años (Oliver y Schäfer, 1895) y los efectos que esta hormona y neurotransmisor provocan se han ido describiendo en animales completos y en preparaciones de tejidos de diferentes especies, así como en células en cultivo. Asimismo, se han hecho diversos estudios para lograr la caracterización farmacológica, bioquímica y molecular, así como de las vías de transducción involucradas en el funcionamiento de los receptores adrenérgicos.

Los agentes adrenérgicos modulan la contracción y relajación musculares, la proliferación celular y otros. La epinefrina provoca el aumento de la fuerza y frecuencia cardíacas y de la presión sanguínea, así como la dilatación de las vías respiratorias. Asimismo, promueve la degradación de glucógeno incrementando la producción de glucosa, moviliza los ácidos grasos del músculo, aumenta la secreción de glucagón y la disminuye la secreción de insulina (Lehninger *et al.*, 1992).

Los receptores adrenérgicos son receptores acoplados a proteínas G. Se dividen en tres tipos: α_1 , α_2 , y β . A su vez, los receptores α_1 se subdividen en a, b y d; los α_2 en a, b y c y los β en 1, 2 y 3 (Revisado en García-Sáinz, 1995).

Los receptores adrenérgicos están acoplados a distintas vías de transducción, mencionaré aquí únicamente aquellas a las que está acoplado el receptor α_{1B} por ser este el receptor que se ha transfectado en las células Rat-1 en estudio.

El receptor α_{1B} consta de 515 aminoácidos y se expresa en hígado, cerebro, riñón, aorta, pulmón y corazón. Está acoplado a la producción de fosfatos de inositol y calcio mediante la PLC, a la liberación de ácido araquidónico via PLA_2 y a la producción de AMP cíclico (Pérez *et al.*, 1993).

Es interesante mencionar que la expresión del oncogen *c-fos* aumenta como resultado de la activación de los receptores α_1 y β en hepatocitos de cuyo (García-Sáinz y Alcántara-Hernández, 1996). En las células Rat-1 transfectadas con los tres subtipos de receptores α_1 (a, b y d), la norepinefrina induce la expresión de *c-fos* y *c-jun* con la participación de la PKC (García-Sáinz *et al*, en prensa).

III. ANTECEDENTES.

Los diferentes tipos de receptor de bradicinina son expresados de manera diferencial de acuerdo con el tejido que se estudie (Regoli y Barabé, 1980; Farmer y Burch, 1992; Regoli *et al*, 1994).

Los receptores de bradicinina se expresan en varias líneas celulares de fibroblastos. Bareis y cols. y Burch y Axelrod reportaron el acoplamiento de los receptores de bradicinina a la fosfolipasa A₂ y a la fosfolipasa C mediante proteínas G en fibroblastos HF y Swiss3T3 (1983, 1987). Blitterswijk y cols. establecieron la participación de las fosfolipasas C y D en la degradación de la fosfatidilcolina estimulada por la bradicinina en los fibroblastos HF (1991). En fibroblastos pulmonares fetales humanos se reportó efecto en la división celular tanto por bradicinina como por des-Arg⁹-BK sugiriendo la presencia, en esta línea celular, de receptores B₁ y B₂ (Goldstein y Wall, 1984). En fibroblastos NIH-3T3 la bradicinina activa el cotransporte de iones a través de ambos tipos de receptor (Hichami *et al*, 1996).

Existen reportes contradictorios acerca de la magnitud de la respuesta a bradicinina y del número de receptores a este mensajero presentes en las células Rat-1. Los fibroblastos Rat-1 tienen una capacidad de respuesta relativamente baja a la bradicinina debido a que expresan un número bajo de receptores a dicho mensajero (Roberts y Gullick, 1989; Prado *et al*, 1997). Por el contrario, esta misma línea celular transfectada con *ras* (Rat-13) aumenta significativamente el número de receptores por célula y la magnitud de la respuesta a bradicinina (Roberts y Gullick, 1989).

Una de las vías de transducción que puede inducir la expresión de oncogenes es la de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) que se activa mediante la acción de *ras*. Los

receptores adrenérgicos son capaces de inducir esta vía con la consecuente expresión de *c-fos* y *c-jun* en fibroblastos Rat-1 (García-Sáinz *et al*, en prensa). Por su parte, el receptor de bradicinina puede activar la vía de la MAPK en miocitos ventriculares de rata (Clerk *et al*, 1996) y tiene actividad mitogénica en las células Rat-1 transfectadas con *ras* (Roberts y Gullick, 1989).

La expresión de los receptores de bradicinina es altamente inducible. Así, por ejemplo, ésta aumenta al elevar los niveles intracelulares de AMPc en células musculares (Dixon, 1994); la presencia de interleucina-2 también promueve la expresión del receptor B₂ (Dray y Perkins, 1993). Por otro lado, Srivastava y cols. encontraron que la respuesta que puede provocar la bradicinina cambia al sobreexpresar el gen *dhf*, éste es un oncogen que codifica para una fosfoproteína de 66 kDa (1986). Es posible que la transfección del receptor α_{1H} cambie los patrones de expresión del receptor B₂ en los fibroblastos Rat-1.

Las células Rat-1 fueron transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1H} con el objeto de estudiar las características y el funcionamiento de dicho receptor. Debido a que no se ha reportado la caracterización de los receptores de bradicinina en células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1H} y a que la magnitud de la respuesta a bradicinina y el número de receptores cambia entre la misma línea celular surgió la pregunta sobre qué comportamiento había en la línea transfectada con el receptor α_{1H} . Por consiguiente, fue necesario llevar a cabo la caracterización de los efectos de bradicinina y sus receptores en las células Rat-1 transfectadas con dicho receptor.

IV. OBJETIVOS.

- 1) Caracterizar los efectos de la bradicinina en fibroblastos de la línea celular Rat-1 transfectados con el receptor adrenérgico α_{1B} , mediante la cuantificación de la movilización de calcio intracelular y la producción de fosfatos de inositol.**
- 2) Caracterizar la farmacología y la función del receptor de bradicinina mediante la medición de la movilización de calcio intracelular inducida por dicho mensajero, así como por otros agonistas y antagonistas selectivos B_1 y B_2 .**
- 3) Caracterizar el receptor de bradicinina expresado en las células Rat-1 transfectadas con el receptor α_{1B} mediante la determinación del efecto de este péptido y otros agonistas y antagonistas selectivos en la producción de fosfatos de [3H]inositol.**

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

Materiales. Las células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1B} fueron proporcionadas por los Drs. L. Allen, Marc Caron y Robert Lefkowitz de la Universidad de Duke en Durham, Carolina del Norte, U.S.A

El medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con y sin inositol así como el antibiótico-antimicótico (10 000 U/ml de penicilina G, 10 000 mg/ml de sulfato de estreptomycin y 25 mg/ml de anfotericina B) se obtuvieron de Gibco BRL; el Fura-2, AM (ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-11)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-2(2' amino- 5' metilfenoxi)- etano -N, N, N', N'-tetraacético, pentaacetoximetil éster) de Molecular Probes y el mioinositol tritidado (Inositol, myo-[2-3H(N)]) de American Radiolabeled Chemicals, Inc. (ARC). El resto de los reactivos se obtuvo de Baker y de Sigma Co. Los agonistas y antagonistas Bradicinina, Lys-BK, des-Arg⁹-BK, D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,*} D-Phe⁷]-BK, N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp¹, Thi^{3,*} D-Phe⁷]-BK y des-Arg⁹,[Leu]⁸-BK fueron adquiridos de Sigma; el Hoe 140 y des-Arg¹⁰-Hoe 140 de RBI.

Medición de calcio intracelular. Se mantuvieron fibroblastos de la línea Rat-1 transfectadas con el receptor α_{1B} en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero bovino fetal, y antibiótico-antimicótico (100 μ g/ml de estreptomycin, 100 unidades de penicilina/ml y 0.25 μ g/ml de anfotericina B) hasta alcanzar la subconfluencia a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se retiró el medio de cultivo y se incubaron toda la noche con medio DMEM sin suero para eliminar los estímulos inespecíficos y una hora en una solución 5 mM de Fura-2,AM en Krebs-Ringer-HEPES-Glucosa con albúmina sérica bovina al 0.05% pH 7.4. Al término de la incubación se retiró la solución y se hicieron tres lavados con solución salina

amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar el Fura-2,AM no incorporado. Posteriormente se resuspendieron las células en una solución 1.27 mM de cloruro de calcio en Krebs-HEPES-Glucosa con albúmina sérica bovina al 0.05% pH 7.4 y se centrifugaron tres minutos a 3000 rpm, paso que se repitió tres veces (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996).

La movilización de calcio intracelular se calculó mediante la medición de la fluorescencia en agitación constante a 37° en un espectrofotómetro que registra la cantidad de fluorescencia (AMINCO-Bowman Series 2) a 340 nm y 380 nm de excitación y a 510 nm de emisión. La concentración de calcio intracelular se calculó con la ayuda de un paquete de computadora a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima de acuerdo con la ecuación $[Ca^{2+}]_i = K_d \cdot [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \cdot [Sf_2 / Sb_2]$. Donde K_d representa la constante de afinidad del Fura-2 por el calcio (224 nM), R la lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias, R_{min} representa la fluorescencia mínima obtenida al adicionar EGTA 5 mM y R_{max} es la fluorescencia máxima obtenida al lisar las células con Tritón X-100 al 1%. Sf_2 y Sb_2 son los coeficientes de proporcionalidad del Fura-2 libre y unido a calcio en la longitud de onda 2, respectivamente (Grynkiewicz *et al*, 1985).

Cuantificación de fosfatos de inositol. Se sembraron fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor adrenérgico α_{1B} en cajas multi-6 con medio DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y se crecieron durante 48 horas. Este medio se sustituyó por medio DMEM sin inositol al 1% de suero con mioinositol tritido ($6\mu Ci/ml$) 24 horas antes del experimento. Se retiró el medio de marcaje. Las células fueron lavadas 2 veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) para eliminar el exceso de mioinositol antes de incubar 20 minutos en una solución 10 mM de cloruro de litio y 1.27 mM de cloruro de calcio en Krebs-HEPES-Glucosa con albúmina sérica bovina al 0.05% pH 7.4. Las células se estimularon durante 15 minutos con bradicinina y kalidina

100 nM en presencia y ausencia de Hoe 140 1 μ M. La reacción se detuvo con ácido perclórico frío al 30% y se congelaron las células a -72° hasta el día siguiente. El sobrenadante se neutralizó con una solución de KOH 1.5 M en HEPES 75 mM y se separaron los inositoles por cromatografía de intercambio aniónico en columnas Dowex AG1-X8 (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996). La elución se hizo con concentraciones crecientes de sales de la siguiente manera: para la obtención de inositol fosfato (IP₁) se eluyó con 5 mM de borato de sodio y 180 mM de formato de sodio; para inositol 1,4-bisfosfato (IP₂) se eluyó con 0.1M de ácido fórmico y 0.4M de formato de amonio, y para separar el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃) se utilizó una solución 0.1M de ácido fórmico y 1M de formato de amonio (Berridge *et al.*, 1983). Se cuantificaron las cuentas por minuto (CPM) de las fracciones colectadas en un contador de centelleo Beckman LS6000SE.

VI. RESULTADOS.

Se estudió la presencia de receptores a bradiginina en fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor adrenérgico α_{1B} . Se cuantificaron los cambios en la concentración intracelular de calcio provocados por la estimulación con bradiginina y los agonistas respectivos. Dicha medición se basó en la fluorescencia emitida por el Fura-2. Este compuesto fluoresce cuando se une a calcio. Se midió la fluorescencia emitida por el quelante a 340 y 380 nm de excitación y a 510 nm de emisión. La fluorescencia máxima de cada trazo se obtuvo lisando las células con una solución de Tritón X-100 al 1%, y para calcular la fluorescencia mínima se agregó inmediatamente una solución de EGTA 5 mM (Fig. 10).

La bradiginina provocó incremento en la concentración intracelular de calcio de hasta 4 veces el valor del basal que fue bloqueado por el antagonista Hoe 140 (Figs. 11 y 12). Se realizó una curva dosis-respuesta a bradiginina en las células Rat-1/ α_{1B} . (Fig. 13). La bradiginina (círculos llenos en la Fig. 13) provocó incrementos en la concentración de calcio desde concentraciones de 1 nM; a esta concentración el efecto fue mínimo, sin embargo, a concentraciones mayores se obtuvo un aumento considerable en la concentración de calcio. La kalidina indujo efectos similares (Fig. 13).

Se calcularon las EC_{50} de la bradiginina y la kalidina. La EC_{50} (dosis efectiva 50) es la concentración a la cual el agente produce la mitad del efecto máximo. La bradiginina provocó una curva dosis-respuesta que presenta una EC_{50} de 56.1 nM. De la misma manera, la kalidina produjo incrementos considerables en el calcio intracelular a concentraciones mayores y el efecto mínimo se produjo a una concentración de 10 nM (triángulos vacíos en la Fig. 13). La EC_{50} para la kalidina fue de 45.8 nM. Los efectos producidos por la bradiginina y la kalidina fueron de magnitud similar: la dosis máxima de ambos compuestos fue aproximadamente de 10^{-6} M y la EC_{50} fue muy parecida.

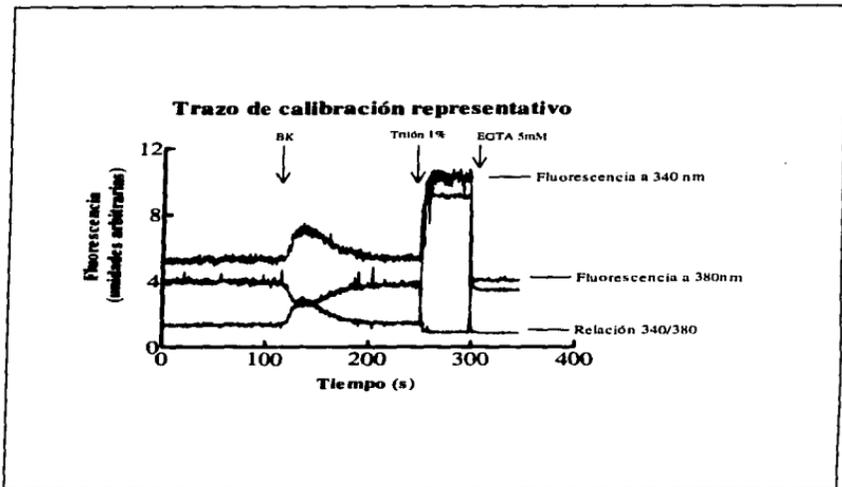


Fig. 10. Trazo representativo de estimulación y calibración. Los fibroblastos Rat-1/ α_{1B} se incubaron con Fura-2, AM. Este quelante fluoresce cuando contiene calcio. Si la concentración intracelular de calcio cambia en respuesta a un mensajero, entonces la fluorescencia emitida por el Fura-2 se modifica. La concentración de calcio libre se calculó a partir de la relación entre la fluorescencia máxima y mínima a diferentes longitudes de onda (340 y 380 nm de excitación). Después de la estimulación con bradicinina 100nM se agregó Tritón X-100 al 1% para lisar las células y así obtener la fluorescencia máxima; para la fluorescencia mínima se adicionó EGTA 5mM.

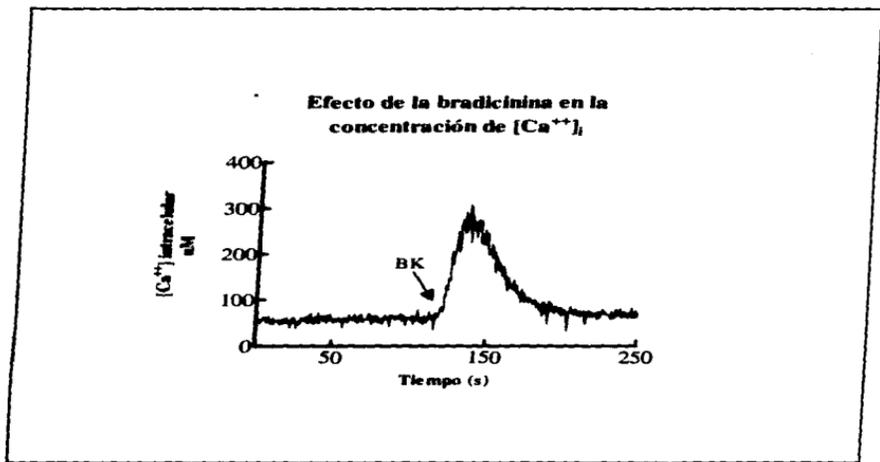


Fig. 11. Aumento de la concentración de calcio intracelular producido por la bradicina. Los fibroblastos Rai-1/ α_{1B} se estimularon con bradicina 100nM. Se midió la concentración de calcio intracelular a partir de la fluorescencia emitida por el Fura-2. La estimulación con bradicina produjo un aumento en la concentración de calcio de hasta cuatro veces el basal. El nivel basal original de calcio no se recuperó después del estímulo. Se presenta un trazo representativo.

**Inhibición del efecto de la
bradicinina por Hoe140**

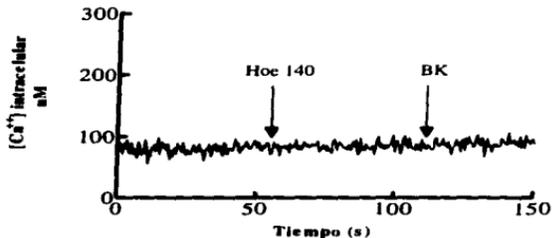


Fig. 12. Inhibición del efecto de la bradicinina en la concentración de calcio intracelular. Se midió la concentración de calcio intracelular de los fibroblastos. Se adicionó Hoe140 (antagonista B_2) $1\mu M$ a los 60 segundos de incubación; posteriormente se agregó bradicinina $100nM$. El Hoe bloqueó el efecto de dicha hormona en su totalidad. Se presenta un trazo representativo.

**Dosis respuesta
Agonistas**

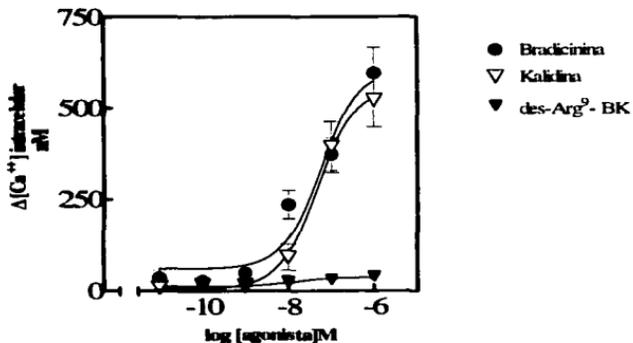


Fig.13. Efecto de la bradicina y agonistas selectivos en la concentración de calcio intracelular. Los fibroblastos Rat-1/ α_{1B} se estimularon con concentraciones crecientes desde 0.01nM con Bradicina (Agonista $B_2 \gg B_1$), Lys-Bradicina o Kalidina (Agonista $B_2 > B_1$) y Des-Arg⁹-Bradicina (Agonista B_1). Se midió la concentración de calcio mediante la fluorescencia emitida por el quelante Fura-2. La EC_{50} se calculó en 56.1nM para la bradicina y en 45.8 nM para la Lys-Bradicina o kalidina. Están representados los promedios con el error estándar de cuando menos tres experimentos independientes. El ajuste de la curva se hizo con la ayuda del programa GraphPrism 2.01 mediante la aplicación de un análisis de regresión no lineal con una curva sigmoidal dosis-respuesta .

Por el contrario, la des-Arg⁹-BK (Agonista B₁), no tuvo sino un efecto muy bajo sobre la concentración de calcio en estas células (triángulos llenos en la Fig. 13).

El efecto producido por la bradicinina y kalidina se bloqueó con antagonistas selectivos. El Hoe 1 μ M eliminó completamente el aumento en la concentración de calcio intracelular provocado por 100 nM de bradicinina (Fig. 12). Ambos antagonistas B₂: N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}-D-Phe⁷]-BK y Hoe140 provocaron una disminución notable en el efecto de la bradicinina de manera dosis dependiente. Se encontró que el N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}-D-Phe⁷]-BK fue menos potente que el Hoe 140 (cuadros y círculos vacíos en la Fig. 14, respectivamente). El primero no logró bloquear totalmente el efecto, incluso a concentraciones de 1 μ M, mientras que el Hoe 140, a dicha concentración, bloqueó el efecto en su totalidad.

La concentración a la que el antagonista bloquea la mitad del efecto inhibitorio máximo que tiene sobre el agonista se conoce como IC₅₀ (Dosis inhibitoria 50). Esta se calculó en 50.1 nM y 9.87 nM para el N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}-D-Phe⁷]-BK y el Hoe 140, respectivamente, por lo que éste demostró ser aproximadamente un orden de magnitud más potente que el primero. Asimismo, se calcularon las constantes de inhibición (K_i) para estos dos antagonistas de los receptores B₂. Esta constante se calcula dividiendo la IC₅₀ por 1+[agonista]/EC₅₀ y refleja la afinidad del antagonista por el receptor. Los valores obtenidos fueron de 18 nM para el N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}-D-Phe⁷]-BK y 3.54 nM para el Hoe 140, lo que significa que este antagonista es más afín al receptor que el N α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}-D-Phe⁷]-BK (Fig. 14). Los antagonistas B₁ empleados en el trabajo fueron menos eficientes en el bloqueo de la actividad de la bradicinina. La aplicación de 1 μ M del des-Arg⁹-Hoe 140 logró disminuir el efecto de la bradicinina hasta en un 28.4%. Por su parte, la des-Arg⁹-Leu⁸-BK no tuvo ningún efecto sobre la actividad de la bradicinina (Fig. 14).

Inhibición del efecto de BK por antagonistas selectivos

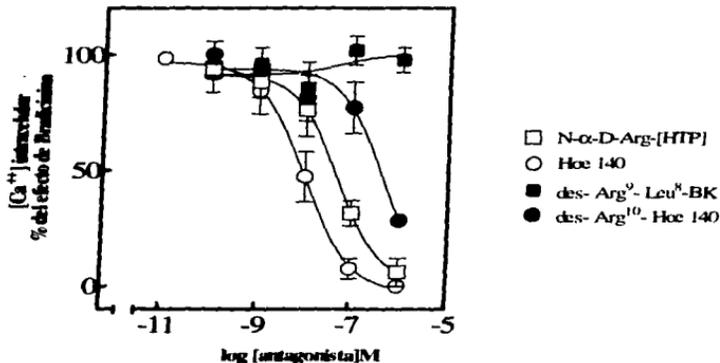


Fig. 14. Bloqueo del efecto de bradicinina por antagonistas selectivos B₁ y B₂. Los fibroblastos se prepararon de acuerdo con lo descrito en Material y Métodos. Se adicionó el antagonista selectivo y 45 segundos después se agregó bradicinina 100nM. Los antagonistas N-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp¹, Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK (□), Hoe140 (○), des-Arg¹⁰-Hoe140 (●) y des-Arg⁹-Leu⁸-BK (■) se aplicaron a concentraciones crecientes para obtener una curva de inhibición. Se calcularon las IC₅₀ en 50.1nM y 9.87 nM para el N-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp¹, Thi^{5,8}, D-Phe⁷]-BK y el Hoe140 (Antagonistas B₂) respectivamente. Además, se calcularon las constantes de inhibición (K_i) en 18nM y 3.54nM para los mismos compuestos. Se representan las medias con el error estándar de al menos tres experimentos independientes. El ajuste de la curva se hizo con la ayuda del programa GraphPrism 2.01 mediante la aplicación de un análisis de regresión no lineal con una curva sigmoideal dosis-respuesta.

De manera similar, el efecto de la kalidina (100 nM) también se bloqueó completamente al adicionar 1 μ M de Hoe 140; de este mensajero sólo se probó la concentración máxima para bloquearla con el Hoe 140 (Fig. 15)

Con el fin de llevar a cabo un análisis más preciso, se calcularon las pendientes de estimulación producidas por los agonistas. Esto se hizo obteniendo la pendiente de la curva mediante la relación $(y_2 - y_1)/(x_2 - x_1)$ entre el punto anterior a la estimulación y el punto del pico de del aumento en la concentración de calcio. Hubo una relación directamente proporcional entre la concentración del agonista y la pendiente de estimulación desde 1 nM hasta 1 μ M; este comportamiento se observó sólo para la bradicinina y la kalidina. La des-Arg⁹-BK no presentó ningún cambio, ni siquiera en las concentraciones más altas ya que, de acuerdo con los resultados anteriores, no se produjo ningún incremento en la concentración de calcio al adicionar este péptido. (Fig. 16)

Las células estimuladas con bradicinina sólo regresaron a los niveles originales de calcio al ser estimuladas con concentraciones bajas de los péptidos (entre 0.1 nM y 10 nM), conforme fue aumentando la concentración del agonista, la diferencia entre la meseta de estabilización posterior a la movilización de calcio y el basal original fue creciendo. Este comportamiento se observó solamente para los agonistas B₂, en cambio, con la des-Arg⁹-BK no se presentó ninguna diferencia debido a que no produjo incremento significativo en la concentración de calcio intracelular (Fig. 17).

Por otro lado, la bradicinina (100 nM) y la kalidina (100 nM) provocaron incrementos en la producción de fosfatos de inositol en los fibroblastos Rat-1/ α_{1H} . El efecto fue mayor en la producción de inositol fosfato (IP₁) y de inositol 1,4-bisfosfato (IP₂); no hubo diferencias en la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato entre los basales y las células estimuladas con los péptidos

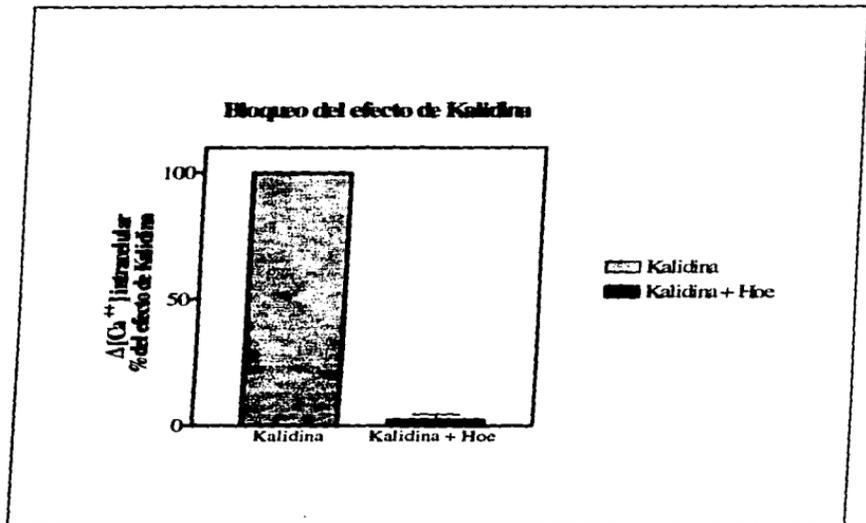


Fig. 15. Bloqueo del efecto provocado por la kalidina en la concentración de calcio intracelular con Hoe140. Las células Rat-1/ α_{1B} fueron estimuladas con kalidina (Lys-Bradicinina) 100 nM en presencia y ausencia del antagonista selectivo B_2 Hoe140 (1 μ M). El efecto de la kalidina se bloqueó en presencia de dicho antagonista. Se presentan los promedios y el error estándar obtenidos en tres repeticiones.

**Pendientes de estimulación
Agonistas**

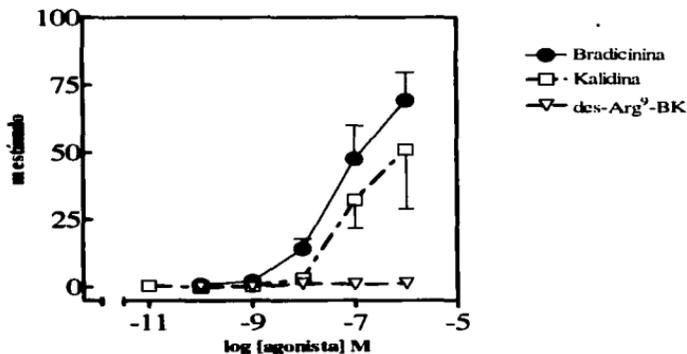


Fig. 16. Dosis dependencia de las pendientes de estimulación provocadas por agonistas. Se estimularon las células Rat-1/ α_{1B} con concentraciones crecientes de bradicinina (agonista $B_1 > B_2$) kalidina (agonista $B_1 > B_2$) y des-Arg⁹-BK (agonista B_1). Se calculó la pendiente de estimulación dada por las diferencias en la concentración de calcio intracelular en el tiempo antes y después de agregar la hormona. A concentraciones mayores la pendiente de estimulación fue mayor para los agonistas B_2 ; sin embargo, no hubo ningún cambio para la des-Arg⁹-BK. Se muestran los promedios y error estándar de cuando menos tres repeticiones.

Diferencia entre el basal y la meseta posterior a la estimulación

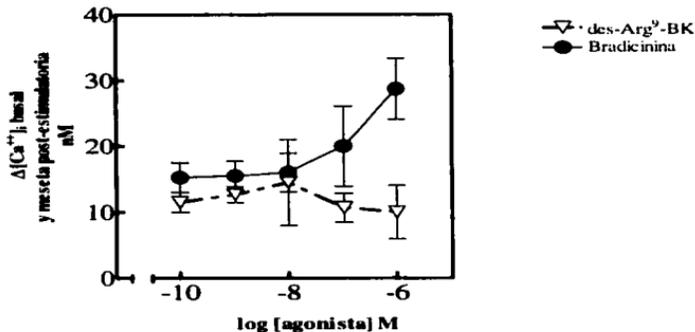


Fig. 17. Recuperación de los niveles basales de calcio intracelular después de la estimulación. Se midió la concentración de calcio intracelular mediante la fluorescencia emitida por el quelante Fura -2. Se calcularon las diferencias entre dicha concentración antes y después de agregar bradicina (agonista $B_2 \gg B_1$) y des-Arg⁹-BK (agonista B_1) a concentraciones crecientes. Las células regresaron a la concentración original de calcio intracelular cuando fueron estimuladas con des-Arg⁹-BK o con concentraciones pequeñas de bradicina; una vez estimuladas con bradicina 100nM o 1 μ M no se recuperó el nivel basal original. Se muestran los promedios y errores estándar de cuando menos tres repeticiones.

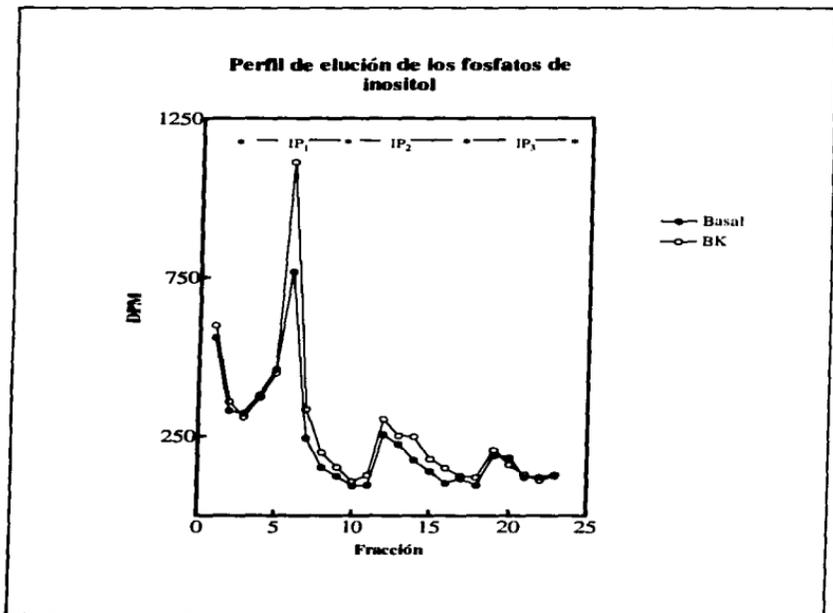


Fig. 18. Perfil de elución de los fosfatos de inositol. Se estimularon las células Rat-1/ α_{12} con 100nM de bradicinina y se separaron el IP_1 , IP_2 e IP_3 por cromatografía de intercambio aniónico. El efecto fue mayor en la producción de inositol fosfato (IP_1) y de inositol 1,4-bisfosfato (IP_2); no hubo diferencias en la producción de inositol 1,4,5-trisfosfato entre los basales y las células estimuladas con la hormona. Se presentan los datos de un experimento representativo.

Efecto en la producción de fosfatos de inositol

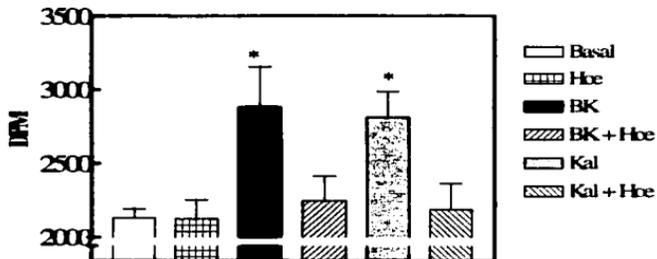


Fig. 19. Efecto de la bradicinina y kalidina en la producción de fosfatos de inositol totales. Se estimularon las células con bradicinina (100nM) y kalidina (100nM) en presencia y ausencia de 1μM de Hoe 140. Se muestra la producción de fosfatos de inositol totales, es decir, la suma de las fracciones correspondientes a cada uno de ellos. El incremento en la producción de fosfatos de inositol (IP₁, IP₂ e IP₃) fue significativo (*) para la bradicinina y la kalidina (p<0.003 y p<0.001, respectivamente). La bradicinina provocó un efecto del 35% mientras que la kalidina incrementó la producción de inositoles en un 32% respecto al basal. El antagonista B₂ Hoe 140 bloqueó el efecto producido por ambos péptidos.

(Fig. 18). Esto se debe a que el litio adicionado a las células bloquea a la monofosfatasa del IP_1 , favoreciendo su acumulación y evitando la producción de inositol. El IP_1 se degrada en IP_2 y éste a su vez en IP_3 (Fig. 4). Las diferencias observadas en la producción de IP_1 e IP_2 reflejan, en cierta medida, las diferencias provocadas en la producción de IP_1 . Estas diferencias se bloquearon con Hoe 140 (no se muestran los datos)

La bradicinina (100 nM) y la kalidina (100 nM) provocaron un incremento significativo en la producción de fosfatos de inositol totales con respecto al basal de acuerdo con la prueba de *t* pareada ($p < 0.003$ y $p < 0.001$, respectivamente). La bradicinina (2878.53 ± 274.5 DPM, $n=7$) provocó un efecto del 35% sobre el basal (2132.3 ± 60.48 DPM, $n=13$); mientras que la kalidina incrementó la producción de inositoles en un 32% (2810.51 ± 174.5 DPM, $n=7$). Dichos efectos fueron bloqueados con 1 μ M del antagonista Hoe 140 (Fig. 19). Las células Rat-1/ α_{1b} expresan receptores a endotelina acoplados a la vía de recambio de fosfoinosítidos y a la movilización de calcio, por lo que se empleó endotelina (1 nM) como control positivo; esta hormona incrementó los fosfatos de inositol en un 140% (no se muestran los datos). Es interesante mencionar que se obtuvo una correlación semejante con los efectos sobre el calcio intracelular. Esto es, la endotelina provocó un incremento en la concentración intracelular de este ion de hasta ocho veces el basal, equivalente más o menos al doble del efecto provocado por la bradicinina. Así pues, la endotelina provocó efectos celulares, tanto en la concentración de calcio como en la producción de fosfatos de inositol, de mayor magnitud que la bradicinina.

VII. DISCUSIÓN.

Las cininas actúan principalmente mediante dos tipos de receptores: B₂ y B₁. Los receptores de bradicinina están acoplados a diferentes vías de transducción de acuerdo con la línea celular. Frecuentemente están acoplados a la fosfolipasa C (PLC); ésta provoca un incremento en la producción de IP₃ y DAG que, a su vez, tiene un efecto en la concentración de calcio intracelular y en la actividad de la proteína cinasa C (PKC). Algunas clonas de las células Rat-1 expresan endógenamente receptores de bradicinina (Quitterer *et al.*, 1995), sin embargo, en estudios de cinética de asociación se ha visto que otras clonas de esta línea celular no contienen cantidades detectables de receptores (Prado *et al.*, 1997) o que el número de receptores por célula es de tan solo 4000, por lo que responden débilmente a la bradicinina (Roberts y Gullick, 1989). El número de receptores aumenta con la transfección de vectores que contienen genes como *ras* y *abl* (Roberts y Gullick, 1989; Srivastava *et al.*, 1986). La síntesis de receptores de bradicinina se incrementa por exposición a la toxina de cólera, a la forskolina y al AMP cíclico (Dixon, 1994). Con el objeto de determinar los efectos de la bradicinina en las células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1B} se midió la movilización de calcio intracelular y la producción de fosfatos de [³H]inositol.

La bradicinina provocó un aumento en el calcio intracelular de hasta 4 veces el valor del basal incrementando la concentración de estos iones en 300 nM (Fig. 11), mucho mayor al efecto reportado por Quitterer y cols. en las células Rat-1 silvestres (1997). La diferencia entre los dos tipos de células es la transfección del receptor α_{1B} , es probable que la respuesta haya sido mayor debido a la presencia de dicho receptor. La kalidina también presentó el mismo comportamiento.

El aumento de calcio intracelular puede deberse a dos factores: por un lado, la liberación de los compartimentos intracelulares (retículo endoplasmático) y por otro, la entrada de iones a través

de canales de la membrana plasmática. La estimulación de la fosfolipasa C provoca un cambio bifásico en la concentración de calcio intracelular, el primero es un pico de corta duración, resultado de la liberación de calcio del retículo; el segundo es una fase en meseta de larga duración que refleja la entrada de iones a través de la membrana; en fibroblastos, la bradicinina es capaz de aumentar la concentración de calcio mediante los dos mecanismos (AbdAlla *et al*, 1996), no obstante, la entrada de iones calcio ocurre en las células en proliferación (AbdAlla *et al*, 1996). La regulación hormonal del contenido total de calcio en la célula depende de la línea celular (Quitterer *et al*, 1995); la bradicinina es capaz de disminuir el contenido de calcio celular en fibroblastos al inducir la liberación de calcio del retículo endoplasmático (AbdAlla *et al*, 1996). Esto ocurre debido a que el estímulo provocado por la bradicinina es lo suficientemente grande para sobrepasar el umbral de activación de las bombas que expulsan calcio de la célula. Dichas bombas se activan y el resultado neto entre la salida de iones del retículo y la salida de iones hacia el exterior provoca una disminución en la concentración celular de calcio. (AbdAlla *et al*, 1996).

Por otro lado, el agonista B₁ des-Arg⁹-BK no tuvo efecto en la concentración de calcio intracelular (Fig. 13). El receptor B₁ es de 10 a 50 veces más afin a la des-Arg⁹-BK que a la bradicinina (Dray y Perkins, 1993). Asimismo, el efecto producido por la bradicinina y la kalidina fue bloqueado completamente por el antagonista selectivo B₂, Hoe 140 (Figs. 13 y 14). El Hoe 140 se desarrolló como un antagonista B₂ muy potente y con resistencia a la degradación proteolítica (Bao *et al*, 1990). De acuerdo con la farmacología típica de los receptores de bradicinina, estos datos indican que el receptor presente en las células Rat-1/α_{1B} pertenece al tipo B₂ como el ya reportado. Otro antagonista específico B₂, el Nα-Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}, D-Phe⁷]-BK, también bloqueó el efecto de la bradicinina; no obstante, se encontró que fue aproximadamente un orden de magnitud menos potente que el Hoe 140 (IC₅₀=50.1 nM y 9.87 nM respectivamente).

Experimentos *in vivo* llevados a cabo en rata mostraron que el Hoe 140 es 1 orden de magnitud más potente que el $N\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,*}, D-Phe⁷]-BK en el bloqueo del efecto hipotensor de la bradicinina sobre la presión arterial (Bao *et al.*, 1991). A su vez, el antagonista B₂ D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,*}, D-Phe⁷]-BK resultó ser un orden de magnitud menos potente que el $N\alpha$ -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,*}, D-Phe⁷]-BK (no se muestran los datos), también de acuerdo a lo reportado por Lammek y cols. (1990)

Los antagonistas B₁ des-Arg¹⁰-Hoe 140 y des-Arg⁹-Leu⁸-BK, prototipos de antagonistas B₁ (Dray y Perkins, 1992; Wirth *et al.*, 1991; Wirth *et al.*, 1995), no tuvieron efecto significativo sobre el incremento en el calcio producido por la bradicinina; estos datos confirman que la bradicinina ejerce sus efectos en esta línea celular vía receptores B₂.

Dentro de los datos analizados, también se calcularon los cambios en la pendiente de estimulación; estos valores fueron aumentando conforme aumentó la concentración de bradicinina y kalidina. La des-Arg⁹-BK no provocó ningún cambio debido a que no tuvo ningún efecto en la concentración de calcio intracelular. Esto significa que la respuesta de la célula es más rápida y más pronunciada mientras mayor es la concentración de hormona aplicada. Estos datos confirman que el efecto de la bradicinina en estas células se media a través de un receptor B₂ y no B₁. Posterior al pico en el aumento del calcio intracelular se sigue un periodo de recuperación, dicho proceso duró alrededor de 1 minuto para todas las concentraciones y péptidos analizados (no se muestran los resultados). El tiempo que tarda la célula en alcanzar la meseta es, en células Rat-1 para la bradicinina, de entre 60 y 80 segundos (Quitterer *et al.*, 1995), es decir, tanto las células Rat-1 silvestres como las Rat-1 transfectadas con el receptor α_{1B} presentan el mismo promedio de tiempo de recuperación.

La estimulación por parte de la bradicinina puede inducir la entrada y salida de iones de

calcio a través de la membrana plasmática (AbdAlla *et al.*, 1996). en las células Rat-1, cuando la concentración de calcio extracelular es 1.8 mM (niveles fisiológicos), la entrada de iones de calcio es mayor a su salida y por lo tanto hay un incremento neto en la concentración intracelular de calcio, este proceso puede ser responsable de que las células estimuladas con concentraciones altas de bradicinina no recuperen los niveles originales de calcio en el citoplasma. Sin embargo, no se estudió la entrada o salida de iones a través de canales de membrana por lo que no se puede afirmar nada al respecto.

Con el objeto de caracterizar parte de la vía de transducción activada por el receptor B_2 se cuantificó la producción de fosfatos de [3 H]inositol. La producción de fosfatos de inositol se incrementó en las células estimuladas con bradicinina y kalidina; no obstante, se obtuvo un efecto de menor magnitud con respecto al basal que el provocado en la concentración de calcio intracelular. Dicho efecto fue bloqueado completamente por el Hoe 140. Estos resultados muestran que la producción de fosfatos de inositol está mediada también vía receptores B_2 en los fibroblastos Rat-1/ α_{1B} .

En consecuencia, podemos afirmar que el receptor B_2 de bradicinina está acoplado, en esta línea celular, a la fosfolipasa $C\beta$ mediante la activación de una proteína G. La producción de fosfatos de inositol resultado de la estimulación con bradicinina ha sido asociada en varios sistemas a diferentes tipos de proteínas G: en células Swiss3T3, así como en células de músculo liso de arteria de conejo, la producción de fosfatos de inositol por la estimulación del receptor B_2 está acoplada a una proteína G insensible a toxina pertussis (Burch y Axelrod, 1987; Tropea *et al.*, 1992). En células MDCK, sin embargo, la PLC está acoplada a una proteína sensible a toxina pertussis G_i/G_o (Portilla

et al., 1988); en este caso, se sabe que el responsable de activar a la PLC es el dímero $\beta\gamma$ de la proteína G_i o G_o (Carozzi *et al.*, 1993). En esta tesis no se analizó el tipo de proteína G involucrada en la transducción de señales del receptor B_2 .

Por otro lado, la activación de la PKC por el DAG en respuesta a la estimulación de bradicinina puede provocar la activación de un sistema de cotransporte $Na^+/K^+/Cl^-$ implicado en la mitogénesis de fibroblastos (Hichami *et al.*, 1996) o la estimulación de la fosfolipasa D (Pyne y Pyne, 1994).

Se han identificado los residuos del receptor B_2 responsables de la activación de la vía de recambio de los fosfoinosítidos (Tyr131), que son también importantes para la internalización del receptor (Prado *et al.*, 1997).

In vivo, la kalidina es dos veces más potente que la bradicinina (Regoli y Barabé, 1980), no obstante, ambos péptidos tuvieron un efecto muy parecido en los dos parámetros metabólicos que se midieron y las EC_{50} para el efecto en la concentración de calcio fueron también muy similares (45.8 nM y 56.1 nM, respectivamente). En otras líneas celulares la kalidina y bradicinina estimulan un incremento transitorio en la producción de IP_1 , IP_2 e IP_3 dependiente de la concentración; dicho efecto constituye hasta tres veces el valor del basal para IP_1 , siendo mayor el efecto de la kalidina que el de la bradicinina (Tropea *et al.*, 1993). El efecto obtenido para las células Rat-1/ α_{1B} es más pequeño: la magnitud del efecto puede variar de acuerdo con la línea celular.

Los resultados obtenidos muestran que los fibroblastos Rat-1 transfectados con el receptor adrenérgico α_{1B} responden a bradicinina aumentando la concentración de calcio intracelular y la producción de fosfatos de inositol. Este efecto está mediado por receptores que,

farmacológicamente, corresponden al tipo B₂.

Lograda la caracterización farmacológica y funcional del receptor de bradicinina presente en esta línea celular, uno de los objetivos siguientes es determinar si hay una regulación del receptor α_{111} por parte del receptor B₂ de bradicinina en esta línea celular. El tipo de proteína G involucrada en la transducción, el número de receptores presentes, si se trata de un receptor típico, el subtipo de receptor son preguntas que también requieren de experimentación posterior.

VIII. CONCLUSIONES.

- Las células Rat-1 transfectadas con el receptor adrenérgico α_{1B} , respondieron a la estimulación con bradicinina elevando la concentración de calcio intracelular e incrementando la producción de fosfatos de inositol.
- La bradicinina y la kalidina tuvieron efectos similares y provocaron un aumento en el calcio intracelular de hasta 4 veces el valor del basal que fue bloqueado por el Hoe 140.
- Por otro lado, la respuesta de la célula es más rápida y más pronunciada mientras mayor es la concentración de hormona aplicada.
- Los datos, de acuerdo con la farmacología típica de los receptores de bradicinina, indican que estas células expresan el tipo de receptor B_2 , y es este receptor el que media los efectos producidos tanto en la concentración de calcio intracelular como en la producción de fosfatos de inositol.
- El incremento en la producción de fosfatos de inositol sugiere que el receptor B_2 está acoplado, en esta línea celular, a una fosfolipasa $C\beta$ mediante la activación de una proteína G. De acuerdo con los datos reportados para otras líneas celulares, es probable que la proteína G implicada en este proceso sea insensible a toxina pertussis, sin embargo, cualquier afirmación al respecto requiere de experimentación posterior.

IX. INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.**Página**

TABLA 1.	Hormonas, lugar de origen y sus efectos	7
TABLA 2.	Farmacología típica de los receptores B_1 y B_2	23
TABLA 3.	Estructura primaria de los antagonistas de los receptores de bradicinina.....	23
FIGURA 1.	Tipos de comunicación celular de acuerdo con la distancia que recorre el mensajero	4
FIGURA 2.	Mecanismos de comunicación celular	5
FIGURA 3.	Ejemplo de un mecanismo de transducción en el que el receptor está acoplado a proteínas G	10
FIGURA 4.	Ciclo de los fosfatos de inositol y del diacilglicerol	11
FIGURA 5.	Diagrama esquemático de la producción y destrucción de las cinnas	17
FIGURA 6.	Estructura primaria de la bradicinina y kallidina	19
FIGURA 7.	Efectos proinflamatorios de los receptores de bradicinina en la microvasculatura	22
FIGURA 8.	Representación esquemática del receptor B_2	25
FIGURA 9.	Efectos producidos por la bradicinina durante los procesos inflamatorios	27
FIGURA 10.	Trazo representativo de estimulación y calibración	38
FIGURA 11.	Aumento de la concentración de calcio intracelular producido por la bradicinina.....	39
FIGURA 12.	Inhibición del efecto de la bradicinina en la concentración de calcio intracelular.....	40
FIGURA 13.	Efecto de la bradicinina y agonistas selectivos en la concentración de calcio intracelular.....	41
FIGURA 14.	Bloqueo del efecto de bradicinina por antagonistas selectivos B_1 y B_2	43
FIGURA 15.	Bloqueo del efecto provocado por la kallidina en la concentración de calcio intracelular con Hoe 140	45
FIGURA 16.	Dosis dependencia de las pendientes de estimulación provocadas por agonistas	46
FIGURA 17.	Recuperación de los niveles basales de calcio intracelular después de la estimulación.....	47
FIGURA 18.	Perfil de elección de los fosfatos de inositol	48
FIGURA 19.	Efecto de la bradicinina y kallidina en la producción de fosfatos de inositol totales	49

X. TABLA DE ABBREVIATURAS.

AC	Adenilato ciclasa
ACE	Enzima convertidora de angiotensina o cinasina II
AMPc	Adensina 5'-monofosfato ciclico
Asn	Asparagina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BK	Bradicinina
Cys	Cisteina
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
D-Phe	Estereoisómero D. fenilalanina
EC₅₀	Dosis efectiva 50
Fura-2	ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-11)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-2(2' amino-5' metilfenoxi)- etano -N, N, N', N'-tetraacético, pentaacetoximetílico
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GMPC	Guanosina 5'-monofosfato ciclico
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
IC₅₀	Dosis inhibitoria 50
IP₁	Inositol fosfato
IP₂	Inositol 1,5-bisfosfato
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
KD	Kalidina
K_i	Constante de inhibición
MAPK	Proteina cinasa activada por mitógenos
Met-Lys-BK	Metilbibradicinina
P_i	Ortofosfato inorgánico
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteina cinasa A
PKC	Proteina cinasa C
PLA₂	Fosfolipasa A ₂
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
Ser	Serina
Thr	Treonina

XI. LITERATURA CITADA.

1. AbdAlla, S., Müller-Esterl, W. y U. Quitterer. 1996. Two distinct Ca^{2+} influx pathways activated by the bradykinin B_2 receptor. *Eur. J. Biochem.* 241: 498-506.
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y J. D. Watson. 1994. Molecular Biology of The Cell. 3rd. ed. Garland Pub. Inc. New York. Pp. 1294.
3. Baltensperger, K., Karoor, V., Paul, H., Ruoho, A., Czech, M. P. y C. C. Malbon. 1996. The beta-adrenergic receptor is a substrate for the insulin receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 271 (2): 1061-1064.
4. Bao, G., Qadri, F., Stauss, B., Stauss, H., Gohlke, P. y T. Unger. 1991. Hoe 140, a new highly potent and long-acting bradykinin antagonist in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 200: 179-182.
5. Bareis, L., Manganiello, V. C., Hirata, F., Vaughan, M. y J. Axelrod. 1983. Bradykinin stimulates phospholipid methylation, calcium influx, prostaglandin formation, and cAMP accumulation in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2514-2518.
6. Berridge, M. 1985. The molecular basis of communication within the cell. *Sci. Am.* 253: 142-152.
7. Berridge, M. J., Dawson, R. M. C., Downes, P., Heslop, J. P. y R. F. Irvine. 1983. Changes in the level of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phospholipids. *Biochem. J.* 212: 473-482.
8. Blaukat, A., AbdAlla, S., Lohse, M. J. y W. Müller-Esterl. 1996. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B_2 receptor from human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271 (50): 32366-32374.

9. Blitterswijk, W. J., Hilkmann, H., de Widt, J. y R. L. van der Bend. 1991. Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266 (16): 10344-10350.
10. Burch, R. M. y J. Axelrod. 1987. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: Evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6374-6378.
11. Butl, S. K., Dawson, L. G. y J. M. Hall. 1995. Bradykinin B₁ receptors in the rabbit urinary bladder: induction of responses, smooth muscle contraction, and phosphatidylinositol hydrolysis. RESUMEN. *Br. J. Pharmacol.* 114 (3): 612-617.
12. Carozzi, A. C., Camps, M., Gierschik, P. y P. Parker. 1993. Activation of phosphatidylinositol lipid-specific phospholipase C-β3 by G-protein βγ subunits. *FEBS.* 315 (3): 340-342.
13. Clerk, a., Gillespie-Brown, J., Fuller, S. J. y P.H. Sugden. 1996. Stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis, protein kinase C translocation, and mitogen-activated protein kinase activity by bradykinin in rat ventricular myocytes: dissociation from the hypertrophic response. *Biochem. J.* 317 (Pt 1): 109-118.
14. Coutant, K. D., Corvalia, N. y N. S. Ryder. 1995. Bradykinin induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor-receptor and focal adhesion proteins in human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210 (3): 774-780.
15. Darnell, J., Lodish, H. y D. Baltimore. 1993. *Biologia Celular y Molecular.* Omega. Barcelona. pp.1188.
16. Dixon, B. S. 1994. Cyclic AMP selectively enhances bradykinin receptor synthesis and expression in cultured arterial smooth muscle. Inhibition of angiotensin II and vasopressin response. *J. Clin. Invest.* 93(6): 2535-2544.
17. Dray, A. y M. Perkins. 1993. Bradykinin and inflammatory pain. *TINS.* 16 (3): 99-103.

18. Farmer, S. G., y R. M. Burch. 1992. Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 511-536.
19. Farmer, S., Burch, R. M., Meeker, S. A. y D. E. Wilkins. 1989. Evidence for a pulmonary B₁ bradykinin receptor. *Mol. Pharmacol.* 36: 1-8.
20. Fior, D. R. y K. Fuxe. 1995. Bradykinin modulation of α_2 -adrenoceptors in the nucleus tractus solitarius of the Rat. An *in vitro* autoradiographical study. *Neuropharmacol.* 34 (1): 81-88.
21. García-Sáinz, J. A. 1995. Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch. Med. Res.* 26 (3): 205-212.
22. García-Sáinz, J. A. y R. Alcántara-Hernández. 1996. α_1 - and β -adrenoceptor activation increases *c-fos* expression in isolated guinea pig hepatocytes. *Pharmacol. Comm.* 7: 107-113.
23. García-Sáinz, J.A., Alcántara-Hernández, R. y J. Vázquez-Prado. Activation of α_1 -adrenoceptor subtypes induces proto-oncogene expression. Role of protein kinase C. *En prensa.*
24. Gelperin, D., Mann, D., del Valle, J. y J. W. Willey. 1994. Bradykinin increases cytosolic calcium in cultured rat myenteric neurones via Bk-2 type receptors coupled to mobilization of extracellular and intracellular sources of calcium: evidence that calcium influx is prostaglandin dependent. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1): 507-514.
25. Gerwins, P. y B. B. Fredholm. 1995. Activation of phospholipase C and phospholipase D by stimulation of adenosine A₁, bradykinin or P_{2U} receptors does not correlate well with protein kinase C activation. RESUMEN. *Neuyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 351 (2): 194-201.
26. Goldstein, R. H. y M. Wall. 1984. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg⁸-bradykinin. *J. Biol. Chem.* 259 (14): 9263-9268.
27. Grynkiewicz, G., Poenie, M. y R. Y. Tsien. 1985. A new generation of calcium indicators with

- greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.
28. Hall, J. M. 1997. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol.* 28 (1): 1-6.
29. Hardman, J. G. y L. E. Limbird. 1996. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9th ed. McGraw-Hill. New York. pp. 1905.
30. Hasler, W. L., Kurosawa, S., Takahashi, T., Fen, H., Gaginella, T. S. y C. Owyang. 1995. Bradykinin acting on B₂ receptors contracts colon circular muscle cells by IP₃ generation and adenylate cyclase inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 (1): 344-350.
31. Hichami, A., Anger, J. P., Allain, N., Vernhet, L., Martin, C. A. C. y A. B. Legrand. 1996. Stimulation of Rb⁺ influx by bradykinin through Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport and Na⁺/K⁺-ATPase in NIH-3T3 fibroblasts. *Life Sci.* 59 (22): 1829-1837.
32. Houslay, M. D. 1991. "Crosstalk": a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem.* 195: 9-27.
33. Issandou, M. y J. M. Darbon. 1991. Des-Arg⁹-bradykinin modulates DNA synthesis, phospholipase C, and protein kinase C in cultures mesangial cells. *J. Biol. Chem.* 266: 21037-21043.
34. Jones, S., Brown, D. A., Milligan, G., Willer, E., Buckley, N. J. y M. P. Caulfield. 1995. Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B₂ receptors and G_{in11}. *Neuron.* 14: 399-405.
35. Joris, J., Meginn, T., Zimmerman, A. y K. Hargreaves. 1987. Local production of immunoreactive bradykinin: two models of inflammation. *Pain.* 4(suppl.), S17.
36. Kammerer, S., Braun, A., Arnold, N. y A. A. Roscher. 1995. The human bradykinin B₂ receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 (1): 226-233.

37. Lammek, B., Wang, Y. X., Gavras, I. y H. Gavras. 1990. A new highly potent antagonist of bradykinin. *Peptides* 11: 1041-1043
38. Lehninger, A., Nelson, D. L. y M. M. Cox. 1992. Principles of biochemistry. 2nd ed. Worth. pp. 1013
39. Liebmann, C., Mammury, K. y A. Graness. 1994. Bradykinin inhibits adenylate cyclase activity in guinea pig ileum membranes via a separate high affinity bradykinin B₂ receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 288 (1) 35-43.
40. Linder, M. E. y A. G. Gilman. 1992. G Proteins. *Sci. Am.* 267: 36-43.
41. Oliver, G. y E. A. Schafer. 1895. The physiological effects of extracts of the suprarenal capsules. *J. Physiol.* 18. 230
42. Pesquero, J. B., Lindsay, C. J., Zeh, K., Paiva, A. C. M., Ganten, D. y M. Bader. 1994. Molecular structure and expression of rat bradykinin B₂ receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269 (43): 26920-26925.
43. Menke, J. G., Borkowski, J. A., Bierilo, K. K., MacNeil, T., Derrick, A. W., Schneck, K. A., Ransom, R. W., Strader, C. D., Linemeyer, D. L. y J. F. Hess. 1994. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269 (34): 21583-21586.
44. Pérez, D.M., DeYoung, M. B. y R. M. Graham. 1993. Coupling of expressed $\alpha 1b$ - and $\alpha 1d$ -adrenergic receptors to multiple signaling pathways is both G protein and cell type specific. *Mol. Pharmacol.* 44: 784-795.
45. Portilla, D., Morrissey, J. y A. R. Marrison. 1988. Bradykinin-activated membrane-associated phospholipase C in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest.* 81: 1896-1902.
46. Prado, G., Taylor, L. y P. Polgar. 1997. Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B₂

- receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (23): 14638-14642.
47. Pyne, S., y N. J. Pyne. 1994. Bradykinin-stimulated phosphatidate and 1,2-diacylglycerol accumulation in guinea-pig airway smooth muscle: evidence for regulation 'down-stream' of phospholipases. *Cell. Signal.* 6 (3): 269-277.
48. Quitterer, U., Schroder, C., Müller-Esterl, W. y H. Rehm. 1995. Effects of bradykinin and endothelin-1 on the calcium homeostasis of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270(5): 1992-1999.
49. Regoli, D. y F. Gobeil. 1995. Pharmacology of kinin receptors: recent developments. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 791-796.
50. Regoli, D. y J. Barabé. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32 (1): 1-46.
51. Regoli, D., Gobeil, F., Nguyen, Q. T., Jukic, D., Seoane, P. R., Salvino, J. M. y D. G. Sawutz. 1994. Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sci.* 55 (10): 735-749.
52. Regoli, D., Jukic, D. y F. Gobeil. 1995. Kinin B₁ and B₂ receptor antagonists and therapeutic perspectives. RESUMEN. *Therapie.* 50 (1): 9-18.
53. Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T. y G. Rosenfeld. 1949. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and trypsin. *Am. J. Physiol.* , 156: 261-273.
54. Roberts, R. y W. J. Gullick. 1989. Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant *ras* oncogene. *J. Cell. Sci.* 94: 527-535.
55. Smith, J. A., Webb, C., Holford, J. y G. M. Burgess. 1995. Signal transduction pathways for B₁ and B₂ receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 47 (3): 525-534.

56. Snider, R. M. y E. Richelson. 1984. Bradykinin receptor-mediated cyclic GMP formation in a nerve cell population (Murine neuroblastoma clone N1E-115). *J. Neurochem.* 43 (6): 1749-1754
57. Srivastava, S. K., Wheelock, R. H. P., Aaronson, S. A. y A. Eva. 1986. Identification of the protein encoded by the human diffuse B-cell lymphoma (*dbl*) oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8868-8872
58. Steranka, L. R. y R. M. Burch. 1991. Bradykinin antagonists in pain and inflammations. *In Bradykinin antagonists: Basic and Clinical Research*, pp.191-211. Edited by Burch, R. M. Marcel Dekker Inc. New York
59. Sung, C-P., Arleth, A. J., Shikano, K., Berkowitz, B. A. 1988. Characterization and function of bradykinin receptors in vascular endothelial cells. RESUMEN. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247:8-13.
60. Tippmer, S., Quitterer, U., Kolm, V., Faussner, A., Roscher, A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W. y H. Haring. 1994. Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms α , ϵ , ξ . *Eur. J. Biochem.* 225: 297-304
61. Tropea, M. M., Gummelt, D., Herzig, M. S. y L. M. F. Leeb-Lundberg. 1993. B_1 and B_2 kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg⁹-bradykinin and bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 930-937
62. Vázquez-Prado, J. y J. A. García-Sáinz. 1996. Effect of phorbol myristate acetate on α_1 -adrenergic action in cells expressing recombinant α_1 -adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 50: 17-22.
63. Vázquez-Prado, J., Medina L. C. y J.A. García-Sáinz. 1997. Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of α_1b -adrenoceptors in rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272

64. Watson, S. y S. Arkininstall. 1994. The G-protein linked receptor. **Facts Book**. Academic Press, USA. pp. 427.
65. Wirth, K., Breipohl, G., Stechl, J., Knolle, J., Henke, S. y B. Schölkens. 1991. Des-Arg⁹-D-Arg[Hyp¹,Thi²,D-Tic³,Oic⁴]bradykinin is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 200:179-182
66. Wirth, K.J., Heitsch, H. y B. Schölkens. 1995. Kinin receptor antagonists: unique probes in basic and clinical research. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 797-804
67. Yaqoob, M., Snell, C. R. y G. M. Burgess. 1995. Carbohydrate analysis of the B₂ bradykinin receptor from rat uterus. *J. Neurochem.* 65 (3): 1290-1295.

XII. LITERATURA ADICIONAL.

1. Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361: 315-325
2. Berridge, M. J. 1995. Capacitative calcium entry models. *Biochem. J.* 312: 1-11
3. Bertrand, C. y P. Geppetti. 1996. Tachykinin and kinin receptor antagonists: therapeutic perspectives in allergic airway disease. *TINS*. 17: 255-259.
4. Biter, K. N. y G. M. Makhoul. 1982. Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science*. 216: 531-533
5. Gilman, A. G. 1987. G Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-49.
6. Nahorski, S. R., Ragan, C. I. y R. A. J. Challiss. 1991. Lithium and the phosphoinositide cycle: an example of uncompetitive inhibition and its pharmacological consequences. *TINS*. 12: 297-302.
7. Stewart, J. M. 1995. Bradykinin B₂ receptor antagonists: development and applications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 73: 787-790
8. Vanderhoek, J. Y. 1990. Biology of cellular transducing signals. Plenum Press, New York. pp. 418.