



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR A BRADICININA TIPO B2 DE HUMANO EXPRESADO EN CELULAS DE INSECTO SF21"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA PRESENTA CLAUDIA SANCHEZ CARDENAS



DIRECTORES DE TESIS: DR. LUIS ALFONSO VACA DOMINGUEZ.

DRA. ANAID ANTARAMIAN SAIZ

2001



292318



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

" CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DEL RECEPTOR A BRADICININA TIPO B2 DE HUMANO EXPRESADO EN CELULAS DE INSECTO SF 21."

realizado por SANCHEZ CARDENAS CLAUDIA

con número de cuenta 8918381-6 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. LUIS ALFONSO VACA DOMINGUEZ

Propietario

DRA. ANAID ANTARAMIAN SALAS

Propietario

M. EN C. OCTAVIO CESAR GARCIA GONZALEZ

Suplente

Q. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO

Suplente

BIOL. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Edna María Suárez Díaz



DR. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

*Con todo cariño a mis padres
Luis y Fausta por darme tanto, por su amor,
por su apoyo, y por comprenderme siempre.*

A mi hermana Nelly por ser una gran amiga

A mis abuelitos por crear esta gran familia

*A Mily, por la alegría que dejaste en
nuestros corazones.*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Transducción de señales: un mecanismo de comunicación celular	2
1.2 Mecanismos de transducción de señales mediados por proteínas G	3
1.2.1 Activación de la Adenilato Ciclasa (Gs)	5
1.2.2 Inhibición de la Adenilato Ciclasa (Gi)	5
1.2.3 Mecanismo de IP ₃ y liberación de calcio	6
1.3 La Bradicinina	6
1.4 Receptores a Bradicinina	12
1.5 Transducción de señales en los Receptores a Bradicinina	15
2. OBJETIVO	17
3. HIPÓTESIS	18
4. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	48
8. REFERENCIAS	49

RESUMEN

Las cininas son un grupo de péptidos vasoactivos involucrados en procesos fisiológicos como la hipotensión, la permeabilidad vascular, la contracción de músculo liso y en procesos patológicos como el dolor, la inflamación, la formación de edema e hiperalgesia. La acción de las cininas se encuentra mediada por la activación de los receptores a Bradicinina tipo B1 y principalmente tipo B2.

Los receptores tipo B2 se localizan en la membrana plasmática, poseen siete dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G. La activación de las proteínas G_q promueve la hidrólisis de fosfatos de inositol a través de la activación de la enzima fosfolipasa C y la consecuente liberación de calcio del retículo endoplásmico.

En este trabajo, el receptor a Bradicinina tipo B2 de humano fue expresado en células de insecto Sf21 utilizando el sistema de baculovirus. Las células fueron infectadas con el virus recombinante durante un periodo de 48-53 horas.

Se realizó la caracterización farmacológica del receptor B2 a través de la aplicación de agonistas y antagonistas específicos. La respuesta de este receptor fue evaluada por medio del incremento en la concentración de calcio intracelular promovido por la aplicación de agonistas, los cuales activaron al receptor de manera dosis dependiente. Los datos se ajustaron a una curva de Hill con la cual se determinaron las constantes de activación: Lys-Bk ($K_{50} = 0.73$ nM), Bradicinina ($K_{50} = 2.57$ nM) y Des-Arg⁹ ($K_{50} = 127$ μ M).

Por otro lado, se probaron antagonistas con el fin de determinar su capacidad para inhibir la respuesta del receptor promovida por Bradicinina. La constante media de inhibición para Hoe fue $K_{i50} = 0.16$ μ M, mientras que los antagonistas N α -adamantaneacetyl-D-ArgfHyp⁹, Thi^{5,8}, D-Phe]-Bk y Des-Arg-[Leu⁹]-Bk a una concentración de 50 μ M no inhibieron la respuesta del receptor promovida por Bradicinina.

Finalmente, se realizó una comparación de nuestros resultados con estudios del mismo receptor en otras líneas celulares, de esta comparación

podemos concluir que la farmacología de agonistas y antagonistas de este receptor es equiparable a lo reportado en células de mamífero.

1. INTRODUCCIÓN

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, así como en la coordinación de funciones como el crecimiento y la división celular (Alberts y cols., 1994). A través de esta comunicación las células son capaces de recibir y responder a información del exterior para satisfacer las necesidades primordiales en un organismo. Este proceso puede llevarse a cabo directamente de célula a célula o por medio de mecanismos más complejos que requieren de moléculas que actúan llevando la señal a distancia; ejemplos de éstas son las hormonas, los neurotransmisores y los factores de crecimiento, los cuales llevan un mensaje específico a un lugar determinado. De acuerdo a la distancia que estos mensajeros tienen que recorrer para alcanzar su blanco, la comunicación se divide en tres tipos: endócrina, parácrina y autócrina (Alberts y cols., 1994).

La señal endócrina utiliza hormonas que se transportan a través del torrente sanguíneo hasta su sitio de acción. En la parácrina, la célula blanco y la célula generadora de la información están en contacto estrecho, por lo tanto, el mensaje llega solamente al grupo celular adyacente, como ejemplo de este tipo de señal se encuentran los neurotransmisores, que propagan los impulsos nerviosos de una célula neuronal a una célula muscular. En la señal autócrina las células responden a sustancias que se liberan por ellas mismas, como es el caso de cultivos celulares.

Frecuentemente una misma sustancia actúa en dos o más tipos de vías de comunicación; ciertos péptidos funcionan como neurotransmisores (señal parácrina) ó como hormonas sistémicas (señal endócrina) (Alberts y cols., 1994).

Los organismos multicelulares han evolucionado gracias a los mecanismos de comunicación celular, de manera que pueden responder a señales de origen extracelular y características diversas, tales como las hormonas, los neurotransmisores y los factores de crecimiento; o bien señales sensoriales como la luz, los olores y los sabores.

1.1 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES: UN MECANISMO DE COMUNICACIÓN INTRACELULAR.

Las células reciben las señales extracelulares, sin embargo, estas no pueden entrar libremente a través de la membrana celular, es necesario que se inicie un mecanismo de reconocimiento que principia con la unión de la molécula extracelular a un receptor específico situado en la membrana; el receptor es una proteína constitutiva, que al unirse a su ligando sufre un cambio conformacional, por medio del cual puede activar a un efector en el interior de la célula. (Alberts y cols., 1994)

Dentro de los receptores existe una superfamilia que se caracteriza por tener 7 segmentos transmembranales y por su acoplamiento a proteínas G. Las proteínas G están formadas por tres subunidades: α , β y γ , las cuales transducen la señal a diferentes efectores, como canales iónicos ó enzimas como la adenilato ciclasa (AC) y la fosfolipasa C (PLC). Tales enzimas actúan sobre un sustrato específico y así producen segundos mensajeros, que se encargan de amplificar la señal original a través de la activación de cinasas y de la liberación de calcio. El número de segundos mensajeros conocidos es relativamente pequeño, lo que hace suponer que las vías de transducción son prácticamente las mismas en todas las células de los organismos. (Alberts y cols. 1994)

Los receptores que se acoplan a las proteínas G están constituidos por un grupo de proteínas localizadas en la membrana, cada receptor es una cadena única constituida de 450 a 600 aminoácidos que se distribuyen en siete dominios transmembranales hidrofóbicos, cada uno está formado por 20-25 aminoácidos y presentan una estructura de hélice α . Estos segmentos están conectados a través de 3 asas extracelulares y tres asas intracelulares (Baldwin, 1993). El extremo amino-terminal se localiza en la porción extracelular y contiene sitios de N-glicosilación, mientras que el carboxilo terminal se encuentra en la parte intracelular y posee una cisteína conservada, la cual puede ser palmitoilada, y formar la cuarta asa intracelular. En la mayoría de estos receptores, las asas 1 y 2 están unidas al segmento 3 a través de un enlace disulfuro, mientras que los residuos intracelulares de serina y treonina, que también están presentes en el carboxilo terminal, están involucrados en el proceso de internalización y desensibilización del receptor.

Visto desde un plano tridimensional, los siete dominios transmembranales del receptor se distribuyen en la membrana en sentido contrario a las manecillas del reloj, como es el caso del receptor a Bradicinina (Fig. 1).

En principio, la transducción de señales se caracteriza por un sistema rígido que acopla un receptor a su efector. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el receptor de membrana representa el primer elemento de tres o más componentes en el sistema de transducción de señales, donde los diversos elementos interactúan secuencial y reversiblemente.

1.2 MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADOS POR PROTEÍNAS G.

Las proteínas G unen nucleótidos de guanina, se encuentran unidas a la cara interna de la membrana plasmática y como se mencionó anteriormente son heterotriméricas.

Actualmente se conocen 23 diferentes subunidades α , que se han dividido en 4 familias $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$. Las subunidades α se codifican a partir de 17 genes diferentes (Simon y cols., 1991), son proteínas con un peso molecular que va de 39 a 52 kDa y comparten entre 45 y 85 % de homología en su secuencia de aminoácidos. El dímero $\beta\gamma$ es un complejo protéico que debido a la estrecha asociación entre cada una de sus subunidades se considera como una unidad funcional. Existen 5 tipos de subunidades β y 11 tipos de subunidades γ . Las subunidades β tienen un alto grado de similitud en su secuencia de aminoácidos (del 53 al 90 %) y su peso molecular es de aproximadamente 36 kDa, mientras las subunidades γ comparten solamente un 25% de similitud (Neer, 1995) y tienen un peso de 6-9 kDa, éstas sufren modificaciones postransduccionales tales como isoprenilación y metilación en el carboxilo terminal. Estas modificaciones permiten la interacción adecuada del dímero $\beta\gamma$ con la membrana plasmática y con la subunidad α , y facilitan que la señal se transmita a sus respectivos efectores.

El modelo general de la activación de las proteínas G consiste en la unión de la hormona o ligando a su receptor el cual, después de sufrir un cambio conformacional, promueve el recambio de GDP por GTP en las proteínas G.

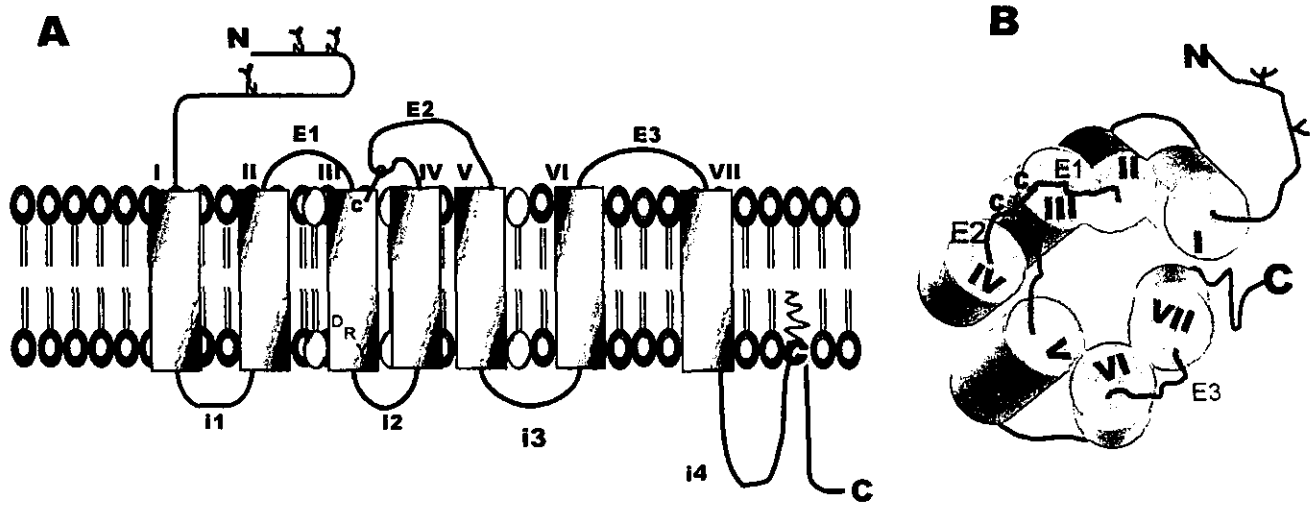


FIG 1. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE BRADICININA.

El receptor a Bradicina pertenece a la familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G, en esta figura se muestra una representación esquemática de este . En A) se representa la estructura de los siete dominios transmembranales (I al VII), conectados entre sí por las asas extracelulares (E1, E2 y E3) e intracelulares (i1, i2 e i3). El amino terminal situado extracelularmente, contiene sitios de N-glicosilación, mientras que el carboxilo terminal situado en la porción intracelular, contiene la cisteína conservada que puede ser palmitoilada para formar la cuarta asa intracelular (i4). El enlace disulfuro altamente conservado conecta a las asas E1 y E2 al segmento III. En B) Se observa el diagrama tridimensional de los siete dominios transmembranales distribuidos en sentido contrario a las manecillas del reloj en la membrana.

En estado de reposo, las subunidades de la proteína G se encuentran formando un complejo, la unión de GTP induce la disociación de las subunidades β y γ de la subunidad α de la proteína G, promoviendo el estado activado de la proteína. Finalmente, la misma $G\alpha$ se inactiva hidrolizando el GTP en GDP con la consecuente liberación de fosfato (P1) y se reasocia a las subunidades β y γ (Alberts y cols., 1994).

La subunidad α y el dímero $\beta\gamma$ disociadas modulan la actividad de sistemas específicos de efectores: como la AC, la PLC, la fosfodiesterasa y canales de calcio y potasio (Bimbaumer, 1992 y Clapham y Neer, 1993). La actividad de estas enzimas efectoras y de los canales iónicos regula la concentración celular de segundos mensajeros (moléculas o iones), responsables de desencadenar respuestas celulares.

1.2.1. ACTIVACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA (Gs)

En esta vía la proteína G se denomina Gs debido a que activa a la enzima adenilato ciclasa. Una vez que la subunidad α de la proteína Gs activa la enzima, ésta sintetiza AMPcíclico (AMPc) a partir de ATP. El complejo catalítico de la adenilato ciclasa, está constituido por el complejo G-GTP. Cuando Gs se asocia con la subunidad α , actúa como una GTPasa, convirtiendo el GTP en GDP, provocando una disociación de la proteína G y la AC, inhibiendo la síntesis de AMPc.

El AMPc es un mensajero de gran importancia que regula funciones como la transcripción genética, la mitogénesis, el estado contráctil de músculo liso y la actividad en canales iónicos. La actividad de la AC está regulada por la acción de diversas hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento a través de las proteínas G. La enzima AC se hidroliza continuamente por la fosfodiesterasa del AMPc, la cual hidroliza el AMPc en adenosin 5' monofosfato (Alberts y cols., 1994).

1.2.2 INHIBICIÓN DE ADENILATO CICLASA (Gi).

El mecanismo mencionado antes puede aumentar o disminuir la concentración del AMPc, dependiendo del tipo de receptor activado para producir la respuesta.

Un ejemplo de son los receptores α_2 adrenérgicos los cuáles están acoplados a

la enzima AC a través de una proteína G inhibitoria denominada Gi. Esta contiene las mismas subunidades $\beta\gamma$ de una proteína Gs, pero posee una subunidad α inhibitoria ($G_{i\alpha}$) que inhibe directamente a la AC, mientras las subunidades $\beta\gamma$ disociadas se unen a las subunidades libres α_s para prevenir la forma activa de la enzima AC (Alberts y cols. 1994).

1.2.3 MECANISMO DE IP₃ Y LIBERACIÓN DE CALCIO (Gq).

Una vez activado el receptor, la proteína Gq activa a la enzima PLC la cual lleva a cabo la vía de recambio de fosfoinosítidos, produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) a partir del fosfatidilinositol 4,5- bifosfato, que es un fosfolípido que se encuentra en la membrana. El IP₃ es un segundo mensajero, que se une a receptores específicos en el retículo endoplásmico produciendo liberación del calcio intracelular. El calcio liberado del retículo endoplásmico puede unirse a la calmodulina, la cual regula la función de un gran número de enzimas, entre ellas algunas fosfodiesterasas, AC, ATPasas de calcio, y la cinasa de la cadena ligera de miosina (Alberts y cols., 1994) (Fig.2). El DAG, por su naturaleza hidrofóbica permanece en la membrana donde puede activar a la proteína cinasa C (PKC) en presencia de calcio. PKC cambia su forma inactiva citosólica a la forma activa membranar donde forma parte de un complejo activo que puede fosforilar diversas proteínas de la célula, tanto membranales como citoplásmicas.

1.3 LA BRADICININA.

En el año de 1909 Abelous y Bardier demostraron que al inyectar intravenosamente a un perro anestesiado una fracción humana de la orina insoluble en alcohol, ésta causaba hipotensión; en 1920 Primbam y Hernheiser observaron el mismo efecto en la presión sanguínea de conejo.

En 1928, Frey y Kraut aislaron de la sangre, de el páncreas y de las glándulas salivales la sustancia que producía esta respuesta, creyendo que se originaba del páncreas, finalmente, tal sustancia fue llamada calicreína (por la raíz griega *kallikreas*

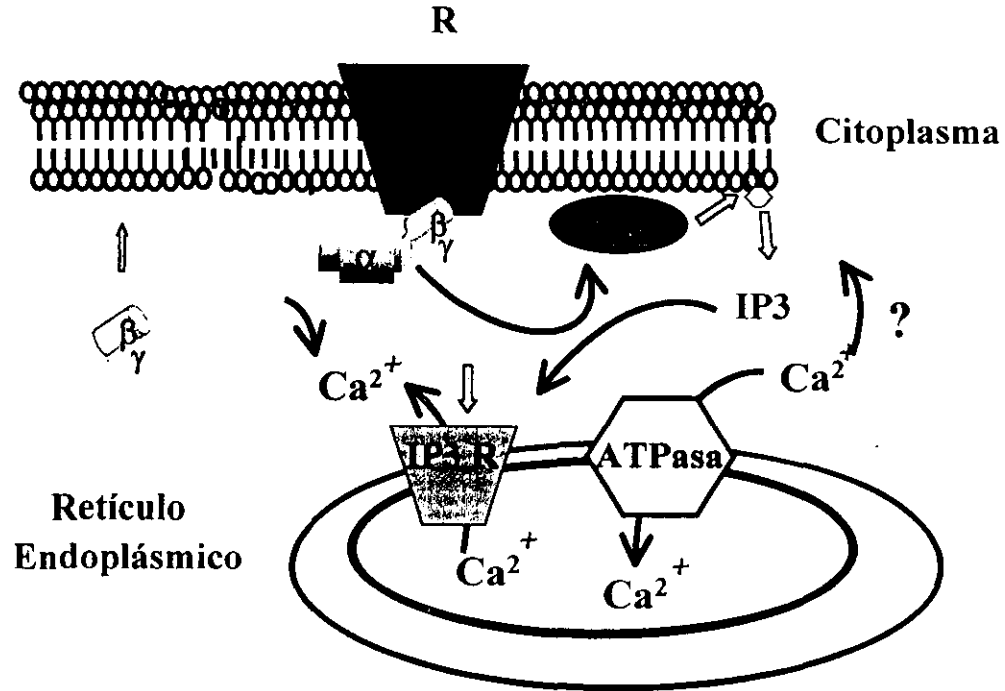


FIG 2. MECANISMO DE IP3 Y LIBERACION DE CALCIO

El receptor a Bradicina se encuentra anclado a la membrana plasmática y al ser activado por la unión de su ligando, sufre un cambio conformacional, favoreciendo la formación de GTP y promoviendo la disociación de las subunidades de la proteína G, $G\alpha$ y $G\beta\gamma$, las cuales activan la formación de IP3, este se forma por hidrólisis de PLC a partir de un fosfoinosítido, se une a su receptor en el retículo endoplásmico y libera calcio.

= páncreas).

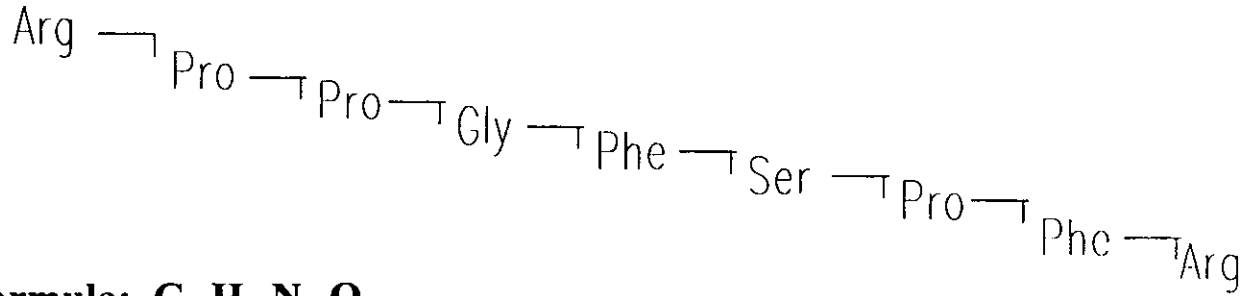
En 1937, Werle y sus colaboradores observaron que cuando la calicreína se incubada con suero, liberaba otra sustancia por actividad enzimática, la cual provocaba contracción muscular a partir de un precursor inactivo (cininógenos) (ver página 11).

Finalmente, en 1949, Rocha y Silva reportaron que cuando incubaban con un extracto de veneno o tripsina la fracción globular del plasma, se originaba una sustancia que producía una disminución en la contracción del intestino aislado de cuyo. Tal disminución era siete veces mayor a la obtenida con histamina o acetilcolina. Siguiendo la nomenclatura, llamaron a esta sustancia Bradicinina por sus raíces griegas: (*bradi* =lento, *cinin* =movimiento). (Bhoola y cols., 1992)

La Bradicinina es un nonapéptido (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) que pertenece a las cininas, un grupo de péptidos vasoactivos que influyen en un gran número de procesos fisiológicos (Fig. 3). La Bradicinina está involucrada en eventos inflamatorios y patológicos como el asma, el dolor, las alergias y en las respuestas inflamatorias post-traumáticas. (Dray y Perkins,1993 , Barnes, 1992). También modula la presión sanguínea, el transporte electrolítico y de glucosa, así como la proliferación celular. Las cininas también promueven la migración de las células sanguíneas a los tejidos cuando, después de un daño, es requerida la activación de células cebadas, fibroblastos y otras células del sistema inmune (Bhoola y cols.,1992).

La síntesis de la Bradicinina en los mamíferos, se lleva a cabo en el plasma y en los tejidos (Fig. 4). En el plasma es formada a partir de las calicreínas plasmáticas, las cuales se expresan sólo en hígado. El proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: cuando el factor XII de coagulación inactivo (Factor Hageman) se une a la superficie de las membranas celulares dañadas y las células endoteliales, promueve la activación de las precalicreínas para formar a las calicreínas. Las calikreinas plasmáticas a su vez liberan a la Bradicinina a partir de los cininógenos de alto peso molecular, mediante la hidrólisis de uniones Lys-Arg y Arg-Ser, para dar lugar a un nonapéptido con argininas en ambos extremos (amino y carboxilo terminal). El sistema de calicreínas plasmáticas también participa en la coagulación sanguínea,

Estructura de la Bradicinina



Formula: $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$
Peso Molecular: 1060
 $3CH_3CO_2H$

FIG. 3. ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA BRADICININA.

La Bradicinina es un nonapéptido vasoactivo involucrado en importantes procesos fisiológicos como dolor, inflamación aguda y vasoconstricción.

FORMACION DE BRADICININA

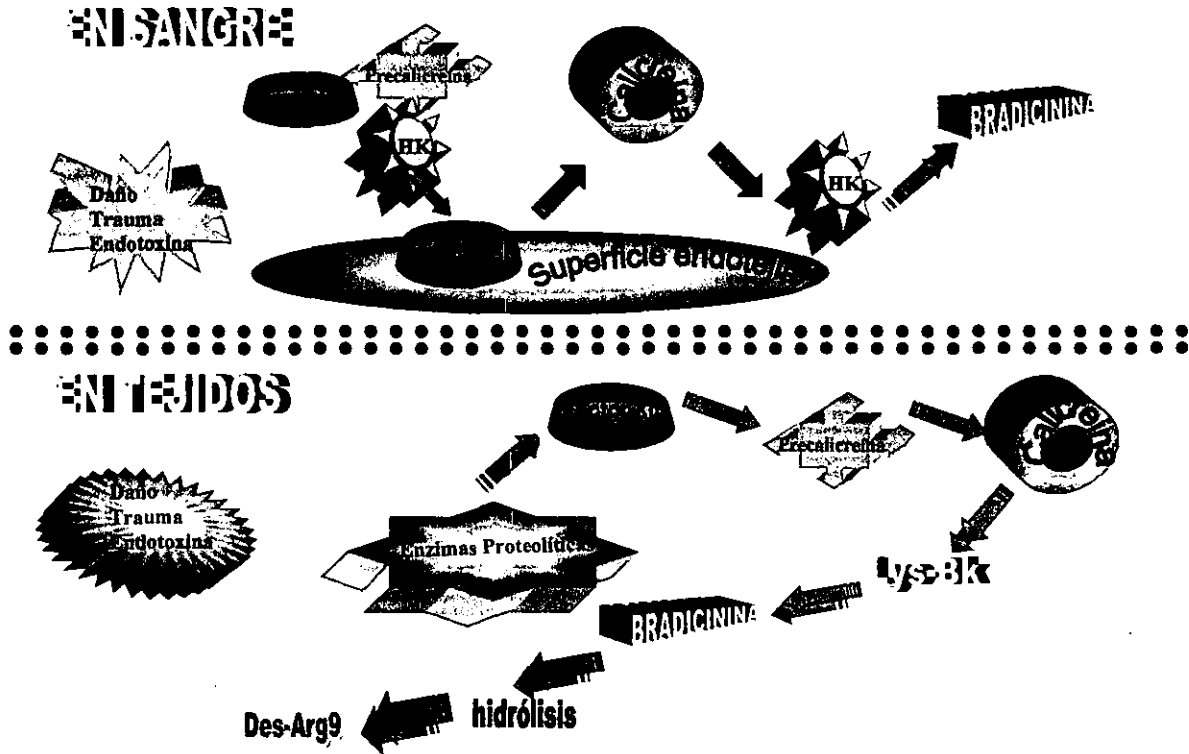


FIG. 4 VIAS DE FORMACION DE LAS CININAS

La Bradicininna es formada a partir de los cininógenos de alto y bajo peso molecular, a partir de la activación de las calicreínas plasmáticas y tisulares; estas enzimas son liberadas cuando existe daño en los tejidos, el esquema muestra además la formación de los agonistas Lys-Bk y Des-Arg9 por hidrólisis de calicreínas y de Bradicininna respectivamente.

la fibrinólisis, la regulación del tono vascular y en la inflamación (Regoli y Barabé, 1980) .

Por otro lado, se encuentran las calicreínas tisulares, que se forman por la proteólisis de las de precalicreínas, en condiciones de daño tisular. Las calicreínas tisulares activadas liberan lisina-bradiginina (Lys-Bk) a partir de los cininógenos de bajo peso molecular. Estas enzimas hidrolizan uniones Met-Lys-Arg en el amino terminal y Arg-Ser en el carboxilo terminal, para dar lugar a un decapeptido con lisina en el amino terminal y arginina en el carboxilo terminal (Regoli y Barabé, 1980 ; Bhoola y cols., 1992).

Aún cuando no es posible formar Bradiginina a partir de cininógenos de alto peso molecular, ésta puede ser formada a partir de Lys-Bk por la participación de las elastasas de los neutrófilos. La producción de las cininas también puede ocurrir de manera independiente al sistema de las calicreínas durante una inflamación aguda, donde proteasas celulares liberadas de células cebadas y basófilos, estimulan la producción de éstas (Proud y cols., 1985).

Las cininas se encuentran en el plasma humano en una concentración de 50 pg/ml. La vida media de la Bradiginina y Lys-Bk en la sangre se estima en aproximadamente 30 segundos (Bhoola y cols.,1992). Las cininas son inactivadas rápidamente por la acción de aminopeptidasas, llamadas cininasas I, que se encuentran en sangre y en tejidos. Estas enzimas remueven la Arg⁹ de la cinina, para dar origen a Des-Arg⁹-Bk, mientras que las cininasas liberan Phe⁸-Arg⁹ (Bhoola y cols.,1992).

Las calicreínas son un grupo de proteasas de serina que se encuentran en las células glandulares, neutrófilos y fluidos. De acuerdo a criterios como el peso molecular, su sustrato y sus características inmunológicas, se dividen en tisulares y plasmáticas (Bhoola y cols., 1992). Las plasmáticas están codificadas por un solo gen, mientras que las tisulares son codificadas por varios genes, expresándose éstas últimas en diversos tejidos.

Las precalicreínas plasmáticas circulan en el torrente sanguíneo unidas al factor XII de la coagulación y a los cininógenos de alto peso molecular.

Los cininógenos son glicoproteínas que tienen una función relevante en la

cascada de la coagulación y en eventos como la inflamación y la protección al daño celular. Existen dos tipos de cininógenos según su estructura, tamaño y afinidad al tipo de calicreínas: los cininógenos de alto peso molecular están constituidos por seis dominios protéicos, mientras los de bajo peso molecular están constituidos por cinco dominios, la región de donde se liberan las cininas se encuentra en el dominio 5 de ambos cininógenos, ambos están codificados por un solo gen. Existe un tercer tipo denominado kininógeno T que solo se presenta en rata.

Cuando ocurre daño vascular, los cininógenos de alto peso molecular se fijan al endotelio (en una región rica en histidina), lo que orienta a los cininógenos de alto peso molecular hacia el factor XII de la coagulación, que al activarse, forma a las calicreínas y al factor de coagulación (Bhoola y cols., 1992).

1.4 RECEPTORES A BRADICININA.

Las cininas ejercen sus efectos a través de la activación de dos tipos de receptores: B1 y B2 a Bradicinina. Esta clasificación está basada principalmente en sus propiedades farmacológicas (Regoli y Barabé, 1980).

Los receptores B1 y B2 son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Hess y cols., 1992; Menke y cols., 1994) y, cuando son activados promueven la hidrólisis de fosfatos de inositol a través de la activación de la fosfolipasa C o de la liberación de ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2. El receptor humano B1 muestra una similitud del 36% con respecto al receptor B2 en humano, y es 78% similar al receptor B1 de conejo (Menke y cols., 1994).

Mientras el receptor B2 a Bradicinina se expresa constitutivamente en múltiples tipos celulares, el receptor B1 puede ser expresado *de novo* por un estímulo del sistema de citocinas, particularmente de la interleucina 1 β (Regoli y Barabé 1980) bajo condiciones inducidas de daño tisular. Además provoca hiperalgesia en modelos animales con inflamación crónica (Dray y Perkins, 1993). Cuando es activado por agonistas, el receptor B2 sufre desensibilización e internalización, mientras que el receptor B1 no se internaliza ni se desensibiliza (Austin y cols., 1994).

El receptor B1 ha sido caracterizado principalmente en preparaciones vasculares de músculo liso, fue descubierto en experimentos de contracción con preparaciones

de aorta, después de una incubación prolongada *in vivo* (Regoli y Barabé, 1980).

La activación de los receptores B1 ocasiona la activación de fibras sensoriales y la liberación de prostaglandinas, del factor de relajación dependiente del endotelio y de noradrenalina en condiciones de inflamación persistente. Sin embargo, la mayoría de los procesos fisiológicos y patológicos que involucran las cininas son mediados por los receptores de tipo B2. Los receptores B2 se han dividido en dos subtipos: presinápticos (neuronal), y postsináptico (músculo liso), con base a su respuesta farmacológica al análogo Bk, [Thi 5,8, D-Phe7]-Bk (Dray y Perkins 1993).

El receptor B₂ se expresa en muchos de los tejidos de rata, humano, cuyo y conejo. Este receptor consta de 364 aminoácidos y tiene un peso molecular de 42 kDa. Tiene un enlace disulfuro (Cys 103-Cys 184), y sitios probables de fosforilación por PKA (Ser 316) y por PKC (Thr170, Thr237 y Thr342) y de glucosilación (Asn3, Asn12 y Asn180). 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 del receptor ligando, sino que es una señal que permite la dirección e inserción del receptor en la membrana plasmática (Watson y Arkininstall, 1994).

Las características farmacológicas de los receptores B2 muestran diferencias entre las especies, lo que ha permitido proponer dos subtipos, el B2_A y el B2_B. El receptor B2_A se expresa en el humano y otras especies como el conejo y el perro, mientras que el B2_B se expresa en los roedores como: el cuyo, el hámster y la rata.

Los subtipos de receptores se han caracterizado usando agonistas y antagonistas selectivos, los cuales son sintetizados de hormonas naturales que proveen evidencia adicional de la saturación y el comportamiento fisiológico relevante de los receptores. Los agonistas mimetizan la función de la hormona que se une a su receptor específico causando la respuesta normal, mientras que los antagonistas se unen al receptor específico inhibiendo la respuesta de la hormona natural. (Alberts, y cols. 1994)

De acuerdo a criterios farmacológicos, varios autores han propuesto la existencia de subtipos nuevos de receptores para Bradicinina, éstos han sido denominados B3, B4 y B5; sin embargo, los genes que codifican para estos tipos no han sido

identificados (Farmer y Burch, 1992, Regoli y cols., 1994).

El grupo de Shild y sus colaboradores realizaron en 1973 el primer estudio de agonistas para caracterizar al receptor tipo B2 y reportaron el siguiente orden de potencia: [Hyp3] BK \geq Lys-Bk, mientras Des-Arg⁹ fue inactiva.

Hasta la fecha se han clonado, expresado y/o caracterizado farmacológicamente el receptor B2 en varios tipos celulares, como en las células C9 de hígado de rata (García-Sainz y Avendaño-Vázquez, 1999), en células de hígado de mono (Hess y cols., 1992) y en células CHO (Eggerickx y cols., 1992) donde se obtuvo el siguiente orden de potencia: Bradicinina \geq [Hyp3]Bk > Lys-Bk > Des Arg⁹- Bk.

Se han realizado estudios de afinidad por el receptor B2 a Bradicinina, para ello se han utilizado diversas técnicas como el pegado específico del radio ligando, y el registro de movilización de calcio intracelular, de los cuales se ha determinado que la Bradicinina promueve un incremento en la concentración de calcio intracelular. En los diferentes estudios realizados hasta la fecha, se observan discrepancias en los resultados obtenidos de acuerdo a la técnica usada, obteniéndose una mayor afinidad en ensayos de pegado específico de unión al radio ligando, técnica mucho más sensible que la determinación de calcio intracelular. Estas diferencias también podrían deberse a factores como la composición iónica del medio y al buffer usado durante el ensayo de pegado específico (Hall, 1992).

Los receptores B2 presentes en las líneas celulares de fibroblastos de pulmón de humano (IMR90 y WI-38) se expresan con diferentes afinidades: receptores de alta afinidad (Kd 440 pM), afinidad intermedia (Kd 5.6 nM) y afinidad baja (Kd 42 nM) a Bradicinina (Dalemar y cols., 1996).

Se han realizado estudios utilizando antagonistas para clasificar farmacológicamente a los receptores de Bradicinina y básicamente se han derivado dos generaciones de antagonistas. En la primera generación se realizó la sustitución del residuo prolina en la posición 7 de la estructura de la Bradicinina por una D-fenilalanina, tal estructura es la que aporta las propiedades antagónicas. A partir de ese momento se estableció, por regla general, que los antagonistas al receptor B2 de bradicinina posean un residuo D-aromático en tal posición (Steward, 1995).

En la primera generación NPC-349 fue uno de los antagonistas que surgió con una alta efectividad; sin embargo, su actividad dura aproximadamente 15 minutos, y su afinidad es muy baja.

Durante la segunda generación se originó una nueva clase de antagonistas en los cuales los residuos en posición 7 y 8 de la Bradicinina fueron reemplazados por una larga cadena hidrofóbica que le confiere mayor potencia y duración al nuevo antagonista HOE-140. Otro antagonista de esta generación es WIN-64338 (Salvino y cols., 1993), un nonapéptido muy potente, sin embargo, no es específico y tiene afinidad por otros receptores como el receptor de acetilcolina y los receptores muscarínicos (Steward, 1995).

El sitio de unión para la Bradicinina en los receptores B2, ha sido determinado mediante el uso de diversos agonistas y antagonistas. La Bradicinina interacciona con una región amino terminal de la tercera asa extracelular y con el extremo carboxilo del VI segmento transmembranal. Por otro lado, experimentos de entrecruzamiento químico combinado con mutagénesis dirigida han permitido evaluar el papel de las cisteínas extracelulares del receptor de humano tipo B2 y su posición relativa al sitio de unión del agonista, encontrándose que Cys 103 y Cys 184 están involucradas en la unión de alta afinidad del ligando Bradicinina, además el amino terminal de la Bradicinina cuando se une al receptor tipo B2, se encuentra adyacente a Cys 20 y Cys 277 (Abd Alla, 1996 y cols).

1.5 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN LOS RECEPTORES A BRADICININA.

Las vías de transducción activadas por el receptor B1 no han sido muy estudiadas, existen algunos reportes que indican que se estimula la síntesis de ácido araquidónico y demuestran además la activación de fosfolipasa C en cultivos de células de músculo liso de aorta en conejo (Shhenker, 1995).

El receptor B2 activa el metabolismo de fosfoinosítidos vía proteínas Gq/Gi insensibles a la toxina pertussis e inhibe la actividad de la AC mediante su interacción con una proteína Gi sensible a la toxina pertussis. Asimismo, su activación provoca la elevación de los niveles de GMPc y la apertura de canales iónicos (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,1990). La PLA₂ cataliza la producción de ácido araquidónico a partir de la fosfatidilcolina y la consecuente secreción de prostaglandinas E₂ e I₂ que, a su vez pueden activar a la adenilato ciclasa. Por su parte, la PLC es activada en células de riñón por medio de una proteína Gi sensible a toxina pertussis. 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 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 y cols. 1996)

Se ha reportado que el calcio liberado durante la activación del receptor B2, puede actuar como mensajero en varias líneas celulares (AbdAlla y cols, 1996). El calcio es importante modulador del efecto de la Bradicinina sobre la contracción muscular, 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 a los receptores B2. Además de la movilización del calcio, se ha estudiado el vaciamiento de pozas intracelulares, la entrada de iones y la actividad de las bombas de calcio en respuesta a la activación de estos receptores (AbdAlla y cols. 1996).

2. OBJETIVO

Caracterizar farmacológicamente el receptor a Bradicinina tipo B2 de humano expresado en células de insecto Sf21 a través del uso de agonistas y antagonistas, utilizando como indicador los cambios en el calcio intracelular.

3. HIPÓTESIS

El receptor B2, al ser expresado en células de insecto se acopla a las mismas vías de transducción que en mamífero. por lo tanto, la farmacología de agonistas y antagonistas del receptor B2 expresado en insecto es equiparable a lo reportado en mamíferos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos son de calidad analítica. Bradicinina, (Des-Arg⁹)Bk, N- α -Adamantaneacetyl-D-Arg-[Hyp³, Thi^{5,6}, D-phe⁷]-Bk, Lys-bk, D-Arg(Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸)- Bk (Hoe 140), Etilen glicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N',- ácido tetra acético (EGTA) y N-[2-hidroxiuetyl-piperazin-N'-[2- ácido etanolsufónico] (HEPES) (SIGMA St. Louis, MO). Fura-2-AM fue adquirido de MOLECULAR PROBES (Eugene, OR).

Cultivo celular

Las células de insecto Sf21(INVITROGEN) fueron crecidas en Medio de Grace (SIGMA), suplementado con lactoalbúmina hidrolizada, yestolate, 10 % de suero de bovino fetal inactivado, 100 μ g/ml estreptomycin y 250 ng/ml amfotericina B (GIBCO, Grand Island, NY) descrito previamente por O'Rely y cols., 1992. Las células fueron cultivadas en medio líquido en matraces de 250 ml, a una temperatura constante de 26°C (y en agitación 100 r.p.m.).(COSTAR, Cambridge, MA).

Producción del baculovirus recombinante

El DNA codificante del receptor humano B2 a Bradicinina fue subclonado en el vector para baculovirus pBlueBac4 usando técnicas estándar de ligación (O'Rely y cols., 1992). La orientación del DNAC fue confirmada por mapeo de restricción. El baculovirus recombinante fue producido siguiendo las instrucciones del manual (INVITROGEN). El baculovirus fue purificado dos veces usando ensayo de placa y posteriormente amplificado. El título de la amplificación fue determinado siguiendo la expresión del gen de β -galactosidasa (O'Rely y cols., 1992). El stock final del virus fue mantenido a 4°C hasta su uso (Fig. 5).

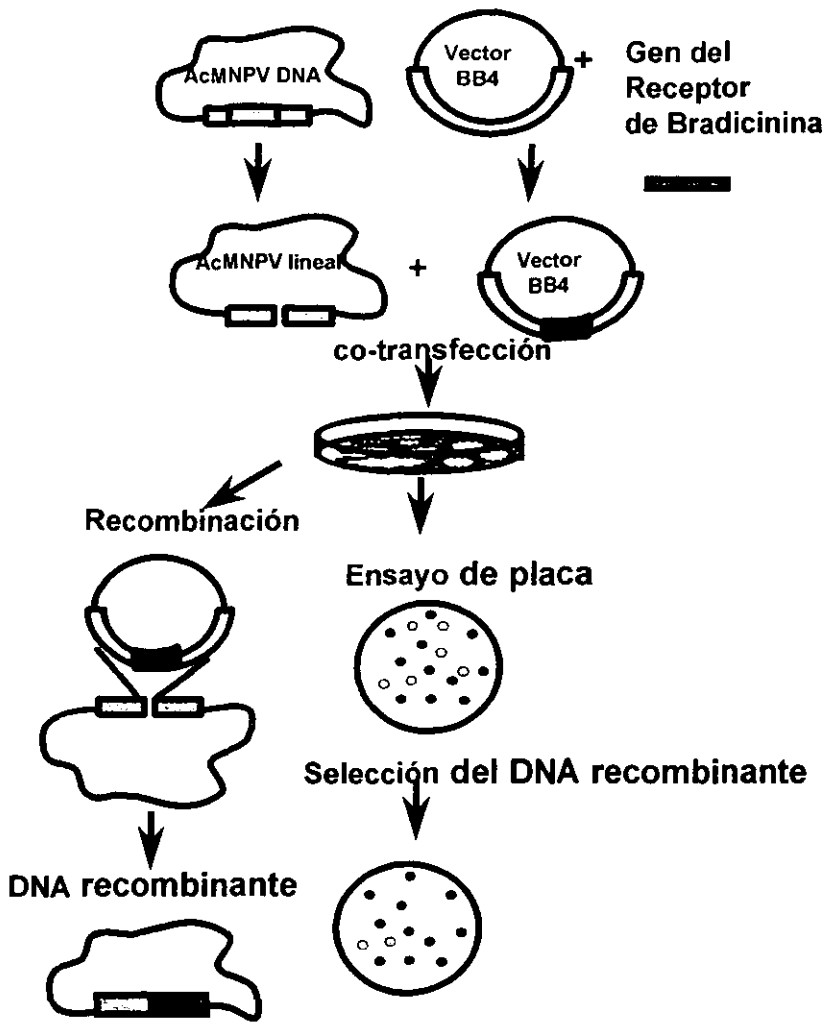


FIG. 5 ESQUEMATIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DEL BACULOVIRUS RECOMBINANTE.

El DNA que codifica para el receptor a Bradicinina tipo B2 de humano fue linearizado y subclonado dentro del vector para Baculovirus BB4, através de una recombinación, el baculovirus recombinante fue producido y posteriormente seleccionado y amplificado en las células de insecto Sf21.

Infección

Una vez alcanzada la concentración de 1×10^6 células/ml, las células Sf21 se infectaron con el baculovirus recombinante a una dilución 1:1000 y se mantuvieron con agitación y temperatura constantes durante un periodo de 48 - 53 horas. El virus tiene una vida media de aproximadamente 4 meses, por lo que fue necesario realizar ampliaciones a lo largo del trabajo experimental.

Microscopía electrónica

Las células se fijaron en glutaraldehído al 3% en fosfatos 0.1M durante 2 horas a 4°C, la post-fijación se llevó a cabo en tetraóxido de osmio al 1% en fosfatos a 4°C. Posteriormente las células se deshidrataron en etanol de 30 a 100% con óxido de propileno y se infiltraron en Epon 1:1 con óxido de propileno, para la inclusión se utilizó Epon al 100% y al 60% para la polimerización durante 48 horas a 60°C. El pellet incluido se cortó en un microtomo Ultracut Reichert-Jung con un grosor de 600-700 Å. Finalmente las células fueron montadas en rejillas de cobre contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo 1% y observadas en un microscopio electrónico de transmisión 1200CXII.

Determinación de la concentración de calcio intracelular

Una vez concluido el tiempo de infección, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo, posteriormente se incubaron con $5 \mu\text{M}$ de Fura-2-AM durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de esto, las células se lavaron y se centrifugaron dos veces más para eliminar el Fura-2-AM de la solución. Se colocó 1.5 ml de células en suspensión (aproximadamente 1.5×10^6 células/ml) en solución de insecto (NaCl 10 mM, KCl 60 mM, MgCl_2 25 mM, CaCl_2 1.8 mM, Glucosa 4 mM, Hepes 15 mM, Manitol 15 mM y BSA 10%) en la celda dentro del fluorómetro Aminco-Bowman series 2 (SLM series II) para realizar cada experimento. La longitud de onda de excitación se fijó a 340 y 380 nm y se leyó alternadamente cada dos segundos, la emisión se registró a 510 nm. La aplicación

de los agonistas se llevó a cabo 50 segundos del registro y la de los antagonistas aproximadamente a los 100 segundos. Cada experimento fue calibrado por separado para obtener el máximo de fluorescencia después de romper las células con 0.1% de Tritón X-100, la mínima fluorescencia fue obtenida después de quelar el calcio en la solución con 20 mM de EGTA. Los valores obtenidos con este procedimiento fueron usados para calcular la concentración de calcio intracelular de acuerdo a la ecuación publicada por Grynkiewicz y colaboradores en 1985 (Fig. 6). La ecuación es la siguiente:

$$[Ca^{++}] = Kd \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

donde:

- [Ca⁺⁺] = concentración de calcio
- Kd = disociación constante efectiva
- F = fluorescencia
- F_{min} = fluorescencia mínima
- F_{max} = fluorescencia máxima

Análisis de datos

El incremento de [Ca²⁺]_i (concentración de calcio intracelular) fue determinado al obtener la diferencia entre el pico máximo de la respuesta después de la aplicación del agonista y el nivel basal al iniciar el experimento. El análisis estadístico fue realizado en el programa de Sigma Plot (JANDEL Co.), posteriormente las gráficas fueron ajustadas en Origin 6.0 a una ecuación de Hill con el fin de obtener la constante de activación (agonistas) o inhibición (antagonistas) medias.

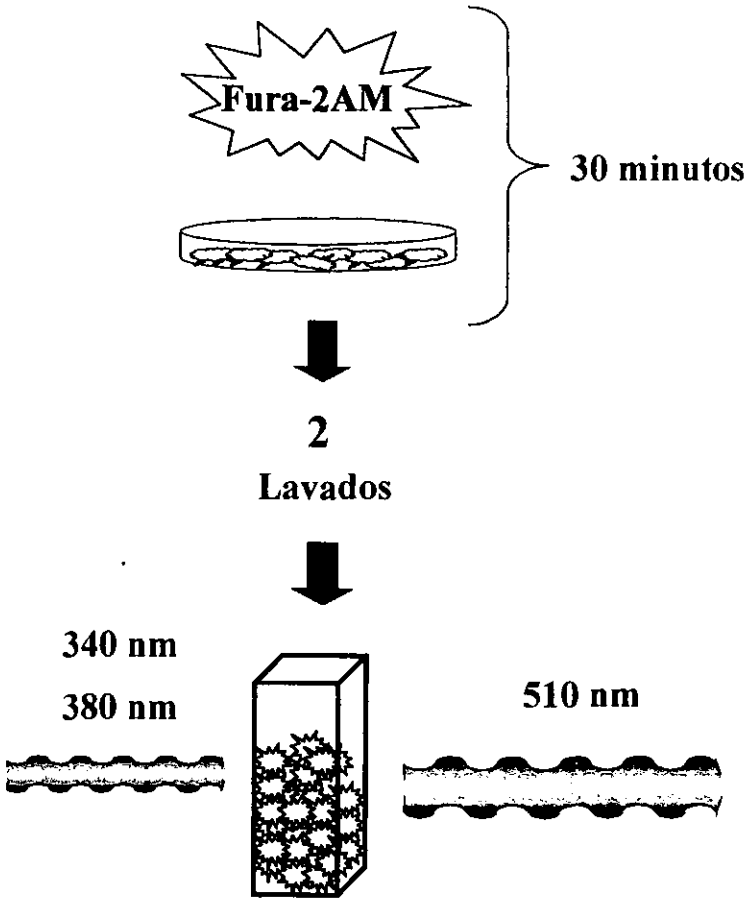


FIG.6 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA CUANTIFICACION DE CAICIO INTRACELULAR. Las células en líquido con 48 horas de infección se incubaron con el marcador fura 2 AM durante 30 minutos, posteriormente se lavaron y se centrifugaron dos veces, finalmente se colocaron en la celda dentro del espectrofluorómetro, el cual emite una longitud de onda de 340 a 380 nm alternadamente, ésta emisión es registrada para poder estimar la movilización de calcio intracelular.

5. RESULTADOS

Una vez infectadas con el baculovirus recombinante, las células de insecto Sf21 fueron observadas al microscopio óptico y comparadas con las células control; las cuales presentan una forma redondeada y color claro. Las células infectadas perdieron su forma y presentaron pequeñas vacuolas en el citoplasma, éstas se incrementaron a medida que se aumentó el periodo de infección.

Para observar con mayor exactitud las diferencias morfológicas encontradas entre las células de insecto Sf21 control y las infectadas con el baculovirus, se tomaron micrografías de ambas en el microscopio electrónico de transmisión (Fig. 7). Como se aprecia en la figura 7, las células infectadas tienen una membrana plasmática muy rugosa, presentan mayor vacuolización y tienen un núcleo más grande que las células control.

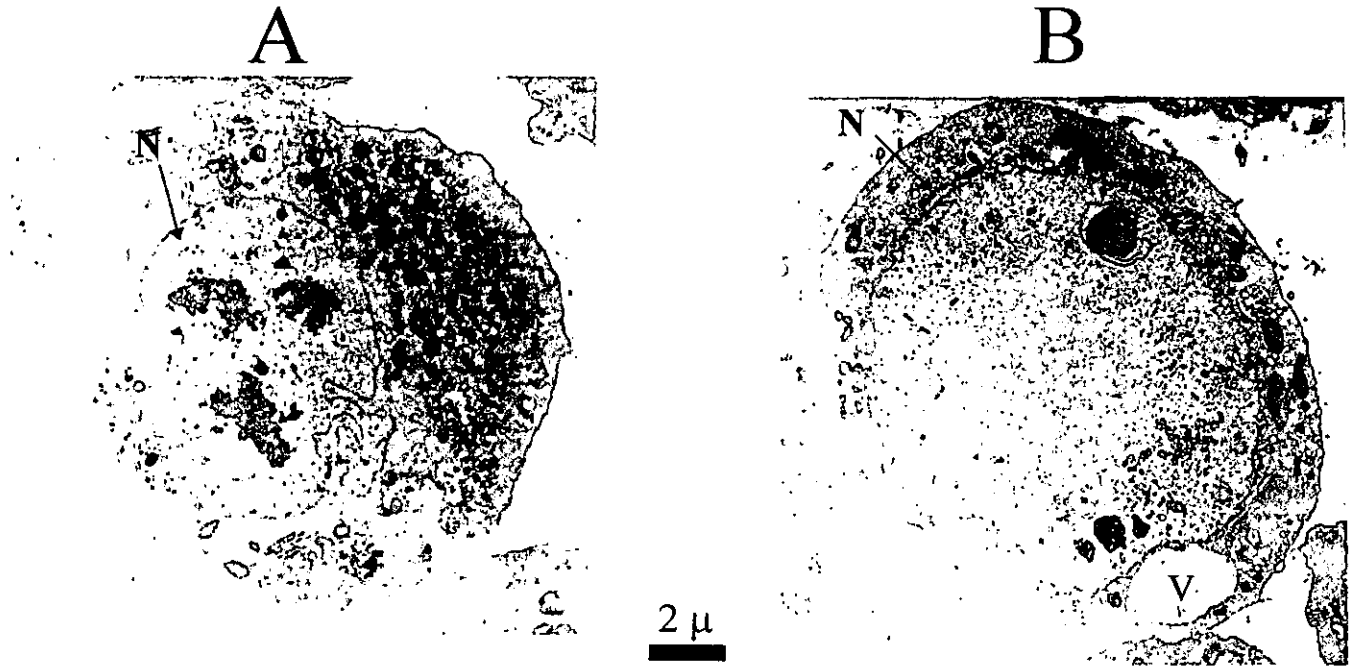


FIG.7 MICROGRAFIA DE CELULAS DE INSECTO SF21 CONTROL E INFECTADAS.

Panel A. Se observa el corte de una célula de insecto Sf21 silvestre.

Panel B. Se muestra el corte de una célula Sf21 con 48 horas de infección con el baculovirus recombinante, la cual presenta un núcleo (N) de mucho mayor tamaño y vacuolizaciones (V).

Antes de iniciar los experimentos con el receptor a Bradicinina realizamos registros de movilización de calcio intracelular en células sin infectar como control de la ausencia de un receptor endógeno que movilice calcio intracelular en respuesta a Bradicinina. La aplicación de 100 nM de Bradicinina no moviliza calcio intracelular en células de insecto no infectadas. (datos no mostrados).

Por otro lado se infectaron células con un baculovirus recombinante conteniendo el DNAC completo para el receptor de Ryanodina tipo 1 de conejo con el fin de verificar si la infección con el baculovirus inducía algún cambio que permitiera a las células responder al estímulo con Bradicinina (control de infección). La aplicación de 100 nM de Bradicinina no promovió movilización de calcio intracelular en células infectadas con el receptor de Ryanodina. (datos no mostrados)

Las diferencias morfológicas entre las células control e infectadas fueron mostradas en la figura 7, el siguiente paso consistió en verificar la expresión funcional del receptor a Bradicinina tipo B2 de humano, para lo cual realizamos experimentos de movilización de calcio intracelular utilizando Bradicinina, agonista específico para el receptor tipo B2.

Para esto, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos: uno con 1.8 mM de calcio extracelular, y un segundo al cual se le agregó 2 mM de EGTA para quelar el calcio extracelular, en ambos casos se agregó 100 nM de Bradicinina.

El experimento control consistió en la aplicación de 100 nM de Bradicinina en condiciones fisiológicas de calcio extracelular (+Ca⁺⁺), ver figura 8. La adición del agonista indujo un incremento inmediato en la concentración de calcio intracelular. Esta respuesta alcanzó un pico máximo aproximadamente a los 170 segundos y descendió manteniendo una meseta que no alcanza el nivel basal inicial de calcio intracelular.

El siguiente experimento consistió en la adición de EGTA al inicio del trazo y la posterior aplicación de 100 nM de Bradicinina (-Ca⁺⁺). Bajo estas condiciones el agonista fue capaz de inducir el incremento instantáneo de la concentración de calcio intracelular, sin embargo, el pico máximo alcanzado por esta respuesta disminuyó aproximadamente un 50% con respecto al experimento control, en este caso, la concentración intracelular de calcio descendió hasta alcanzar el nivel basal (previo a la aplicación del agonista).

Los resultados obtenidos sugieren que la activación del receptor por Bradicinina incrementa la concentración de calcio intracelular, el cual proviene tanto del calcio que sale de pozas intracelulares como de la entrada de calcio del medio extracelular.

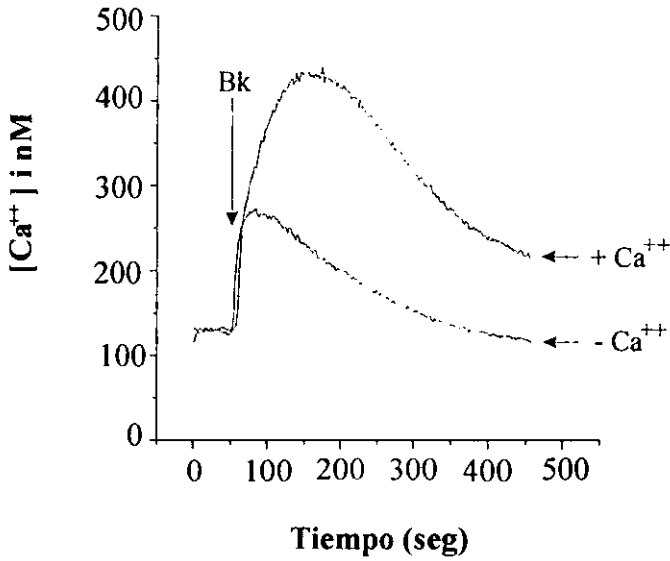


FIG 8. EXPRESIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR A BRADICININA TIPO B2 DE HUMANO EN CÉLULAS DE INSECTO SF 21.

Efecto de 100 nM de Bradicnina en el incremento de calcio intracelular con 1.8 mM de calcio extracelular (flecha horizontal superior) y en ausencia de calcio extracelular posterior a la adición de 6 mM de EGTA (flecha horizontal inferior)
La flecha negra vertical indica el momento de aplicación del agonista.

Una vez lograda la expresión funcional del receptor, realizamos una curva dosis-respuesta a Bradicinina con el objeto de determinar su constante de activación media (K_{50}). Los resultados se muestran en la figura 9 A, donde se observa que el agonista promueve un incremento en la concentración de calcio intracelular de tipo dosis dependiente. La dosis 100 nM de Bradicinina provocó el incremento máximo de la concentración de calcio intracelular, mientras que a dosis menores de 0.13 nM, el agonista no promueve respuesta alguna.

En el panel B de la figura 9 se observa la curva dosis respuesta a Bradicinina, la curva fue ajustada al modelo de Hill con el cual se obtuvo el valor de $K_{50} = 2.57$ nM para Bradicinina.

A continuación se aplicó la prueba estadística t de student a las dos concentraciones más altas del agonista (10 nM y 100 nM). Con lo que concluimos que no existe una diferencia significativa entre las dos últimas concentraciones probadas ($p = 0.71$).

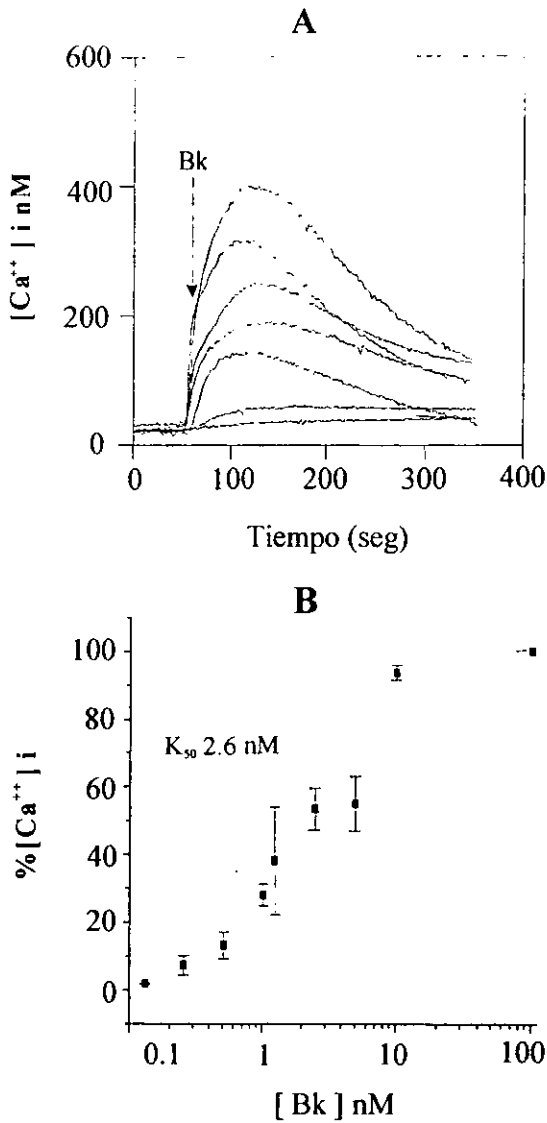


FIG. 9. CURVA DOSIS- RESPUESTA A BRADICININA.

Panel A. Incremento en la concentración de calcio intracelular en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de Bradicinina (0.13, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 y 100 nM). La flecha vertical indica el momento de la aplicación del agonista.

Panel B. Curva dosis respuesta a Bradicinina ajustada al modelo de Hill (línea roja). Se muestra graficado el error estándar n=7.

Para continuar con el estudio farmacológico del receptor, probamos el agonista Lisina-Bradicinina (Lys-Bk), con el objeto de determinar si activa al receptor. Este agonista fue capaz de inducir movilización de calcio intracelular y promovió una respuesta de tipo dosis dependiente. La dosis máxima aplicada fue 10 nM, mientras que a la concentración de 0.05 nM no se observó respuesta alguna. (Fig. 10 A).

A continuación realizamos una curva dosis respuesta para determinar su constante de activación. La curva se ajustó al modelo de Hill, y mediante este análisis obtuvimos el valor de $K_{50} = 0.73$ nM. (Fig. 10 B)

Los valores con las últimas concentraciones aplicadas no difirieron significativamente ($p = 0.11$; prueba t de student), lo que indica que el receptor se satura con la dosis máxima aplicada (10nM).

Los resultados obtenidos con Lys-Bk muestran que activa al receptor en estudio con una potencia 3.5 mayor que Bradicinina, agonista natural del receptor.

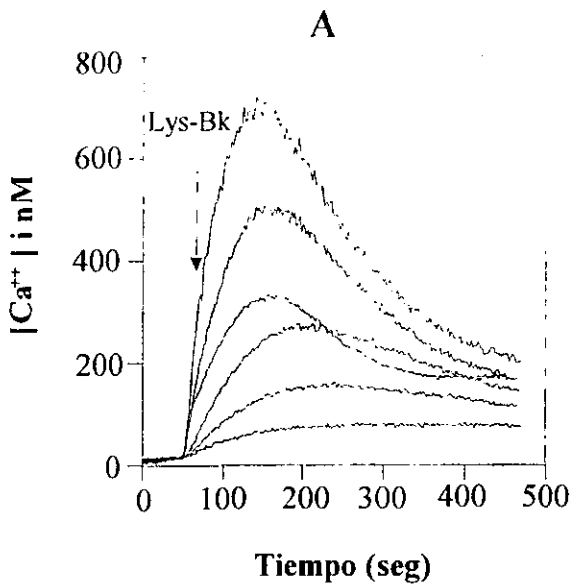


FIG. 10 CURVA DOSIS-RESPUESTA A LYS-BK.

Panel A. Incremento de la concentración de calcio intracelular en respuesta a la aplicación de dosis crecientes de Lys-Bk (0.05, 0.1, 0.5, 1, y 10 nM). El momento de aplicación del agonista es indicado por la flecha vertical.

Panel B. Curva dosis respuesta a Lys-Bk ajustada al modelo de Hill (línea roja). La gráfica muestra el error estándar. n=8

Posteriormente probamos Des-Arg⁹, agonista específico para el receptor a Bradicininina tipo B1, para determinar si era capaz de activar al receptor tipo B2 en este modelo.

Este agonista promovió un incremento en la concentración de calcio intracelular, por lo que a continuación realizamos una curva dosis-respuesta, con el objeto de determinar su K₅₀.

La figura 11 A, muestra que Des-Arg⁹ activa al receptor tipo B2 de manera dosis dependiente. La concentración utilizada para obtener la respuesta máxima en el incremento de calcio intracelular fue de 400 μM, dosis aplicadas menores a 0.5 μM no promovieron la movilización de calcio intracelular. A diferencia de los dos agonistas probados anteriormente cuyas dosis se ubicaron en el rango nM, Des-Arg⁹ requirió de la aplicación de dosis en el orden μM para activar al receptor.

La figura 11 B muestra la curva dosis respuesta a Des-Arg⁹ ajustada al modelo de Hill(K₅₀ =127μM).

Los resultados anteriores indican que este agonista activa al receptor tipo B2 en este estudio con una potencia 50,000 veces menor que Bradicininina y 175,000 veces menor que Lys-Bk.

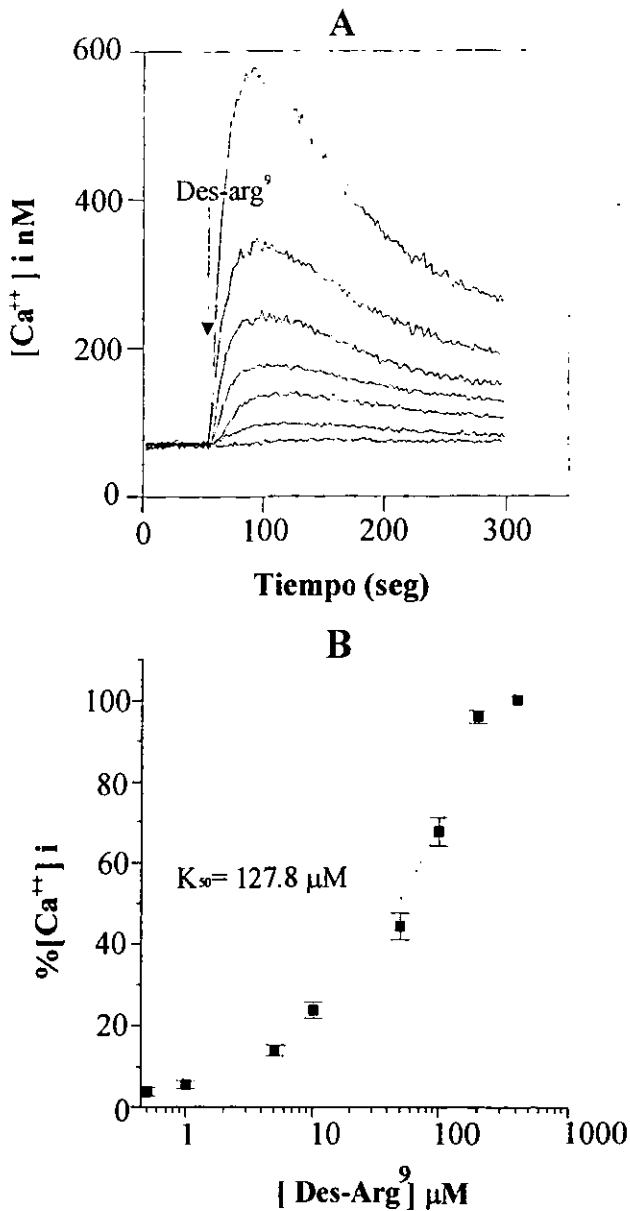


FIG. 11 CURVA DOSIS-RESPUESTA A DES-ARG⁹.

Panel A. Incremento en la concentración de calcio intracelular en respuesta a la aplicación de las dosis crecientes de Des-Arg⁹; (0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, y 400 μM). La flecha negra indica el momento en que se aplicó la Des-Arg⁹.

Panel B. Curva dosis respuesta a Des-Arg⁹ ajustada al modelo de Hill (línea roja). Se muestra graficado el error estándar. n=6.

Realizamos una gráfica comparativa para mostrar las diferencias entre las concentraciones requeridas por los agonistas para activar al receptor tipo B2 en este estudio (Fig. 12). En esta figura se observan las curvas dosis respuesta de los tres agonistas probados, ajustadas cada una a una curva de Hill. Lys-Bk fue el agonista más potente ($K_{50} = 0.73\text{nM}$), seguido de Bradicinina ($K_{50} = 2.57\text{nM}$) y finalmente Des-Arg⁹ fue el agonista más débil ($K_{50} = 127\ \mu\text{M}$)

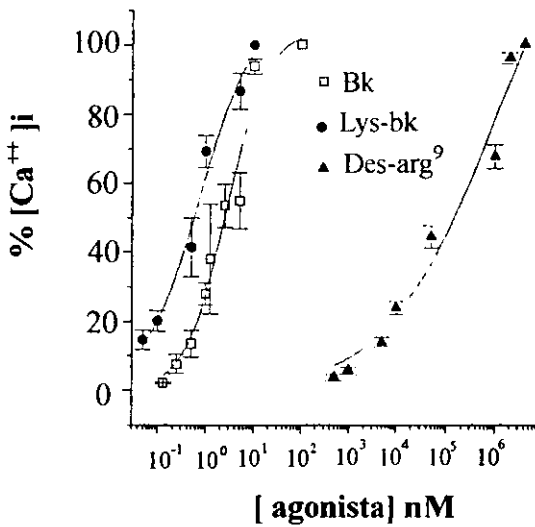


FIG.12. CURVAS DOSIS-RESPUESTA COMPARATIVAS.

Gráfica comparativa que muestra las curvas dosis respuesta de los agonistas utilizados, en cuadros se muestra Bk ($p= 0.71$), en círculos Lys-Bk ($p= 0.11$) y Des-arg⁹ en triángulos ($p= 8.11$)

La potencia con que cada agonista activó al receptor tipo B2 en este estudio fue mostrada en los resultados anteriores (Fig. 12). Una vez determinada la dosis saturante de cada agonista (Bradicinina 100nM, Lys-Bk 10nM y Des-Arg⁹ 400μM), analizamos el incremento en la concentración de calcio intracelular promovido por cada uno con el objeto de comparar si la aplicación estas incrementan concentraciones diferentes de calcio intracelular, realizamos una serie de experimentos de movilización de calcio intracelular utilizando estas concentraciones en experimentos independientes, los cuales muestran que a dosis saturantes, Lys-Bk fue el agonista que promovió un mayor incremento en la concentración de calcio intracelular, seguido de Bradicinina y finalmente Des-arg⁹ (Fig. 13 A).

El panel B de la figura 13, muestra el incremento de calcio intracelular promovido por cada agonista en términos porcentuales. Como se puede ver, Lys-Bk movilizó más calcio intracelular, este dato se tomó como 100% de la respuesta; con lo que se obtuvo que Bradicinina moviliza 87%, mientras Des-arg⁹ incrementó la concentración de calcio intracelular en un 67% respecto al agonista más potente.

Los resultados anteriores indican que el agonista más débil de este trabajo, Des-Arg⁹, requiere de una dosis mayor (rango μM), para activar al receptor, y a su vez moviliza menos calcio comparado con el agonista más potente Lys- Bk, el cual activa al receptor en el rango nM, movilizandando más calcio intracelular.

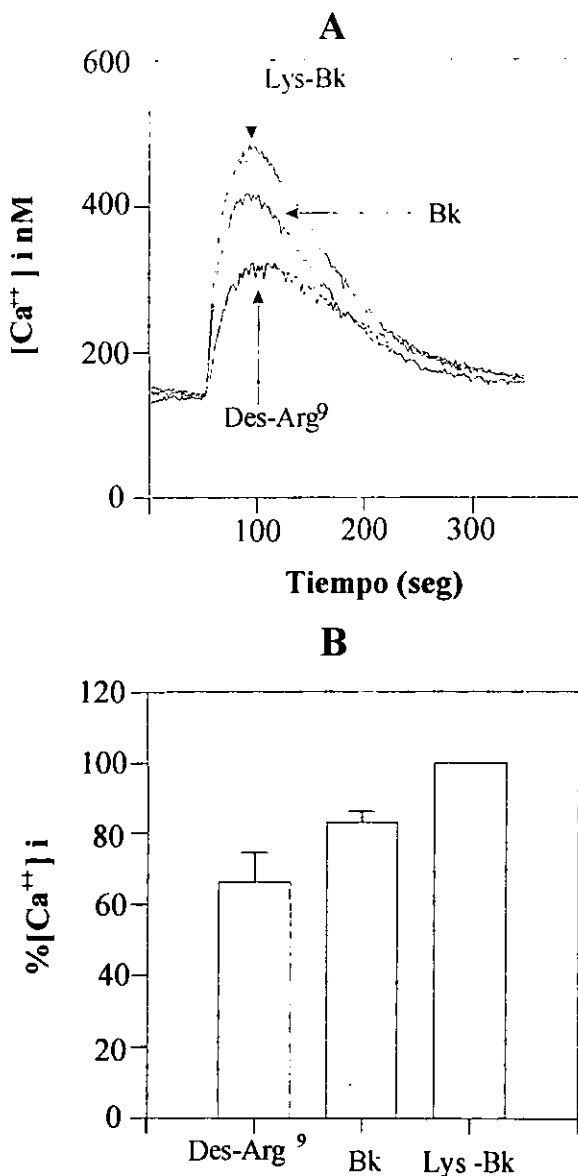


FIG 13. INCREMENTO DE CALCIO INTRACELULAR PROMOVIDO POR LA APLICACIÓN DE LA DOSIS SATURANTE DE CADA AGONISTA.

Panel A. Incremento en la movilización de calcio intracelular promovido por la aplicación de las dosis saturantes de los agonistas: Lys-bk 10 nM, Bk 100 nM y Des-arg⁹ 400 μ M.

Panel B. Diferencias porcentuales del incremento de calcio intracelular en respuesta a la aplicación de las dosis máximas de los agonistas n=5.

Para complementar la caracterización farmacológica de este receptor, probamos varios antagonistas con el fin de determinar si pueden bloquear la activación producida por Bradicinina.

Realizamos experimentos de detección de cambios en el calcio intracelular, en los cuales se utilizó como control la dosis saturante de Bradicinina previamente determinada (100 nM). El primer antagonista aplicado fue Hoe 140. La figura **14 A** muestra que conforme se aplica una mayor dosis del antagonista, disminuye el incremento de calcio intracelular promovido por Bradicinina. De esta manera se puede observar que a la concentración de 1 μ M, Hoe 140 abate aproximadamente el 80% de la respuesta a Bradicinina.

En el Panel **B** de la figura **14** se observa la curva dosis respuesta a Hoe-140 ajustada al modelo de Hill ($K_{i50} = 0.16\mu\text{M}$).

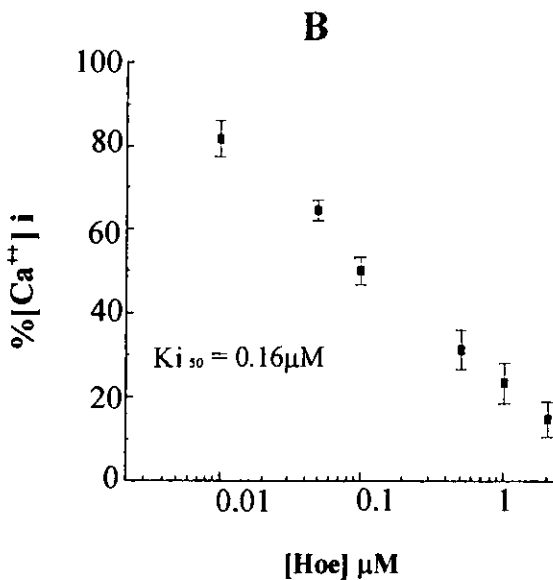
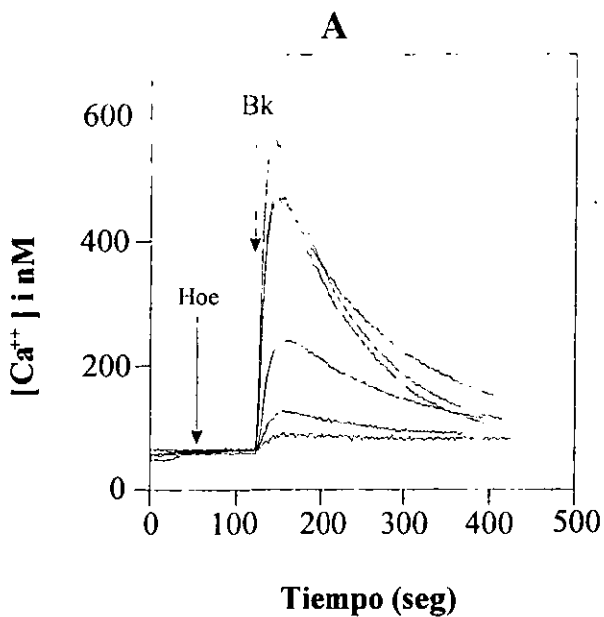


FIG. 14. CURVA DOSIS-RESPUESTA A HOE-140.

Panel A. Disminución de la concentración de calcio intracelular inducida por la aplicación de dosis crecientes de Hoe-140: 0.0010, 0.0050, 0.010, .050, .50 y 1 μM , previas a la aplicación de 100 nM de Bradicinina. Las flechas indican el momento de aplicación de Hoe-140 y de Bradicinina.

Panel B. Curva dosis respuesta de Hoe-140 ajustada al modelo de Hill. Se muestra graficado el error estandar. n=6

De la misma manera probamos el antagonista $N\alpha$ -adamantaneacetyl-D-Arg(Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe)-BK, sin embargo, aún cuando se trata de una agonista específico para este tipo de receptor, no logró inhibir la respuesta de Bradicinina a la dosis máxima probada en este estudio (50 μ M) (Experimentos no mostrados).

Finalmente fue probado el antagonista Des-Arg-[Leu]⁸, específico para el receptor a Bradicinina tipo B1, el cual no inhibió la movilización de calcio promovida por Bradicinina. Cabe mencionar que Des-Arg-[Leu]⁸ actuó además como un agonista parcial, ya que promovió un incremento de la concentración intracelular de calcio. (Datos no mostrados)

Los resultados farmacológicos obtenidos de este estudio con el receptor a Bradicinina tipo B2 de humano expresado en células de insecto, fueron comparados con trabajos previos en los cuales expresaron el mismo receptor en otros tipos celulares. Los datos comparativos se encuentran en la tabla 1. Bradicinina se comportó como un fuerte agonista en este estudio K_{50} (2.57 nM) con respecto a resultados obtenidos en células Sf21 (K_{50} = 50 nM) de un trabajo anterior y en células C9 de rata (K_{50} = 5 nM). Sin embargo, se mostró 100 veces menos potente en comparación a un estudio realizado en células CHO (K_{50} = 30 pM).

En lo que respecta al agonista Lys-Bk, este fármaco se comportó como el agonista más potente (K_{50} = 0.73 nM), incluso comparado con las líneas celulares CHO (K_{50} = 1 nM), y C9 (K_{50} = 20 nM).

Des-Arg⁹, que se comportó como el agonista más débil en este trabajo (K_{50} = 127 μ M); ha sido reportado como inactivo a la dosis de 1 μ M y no probaron dosis mayores.

K₅₀

Células	CHO	C9	SF21	SF21
Agonistas	•	••	•••	
Bk	3X10 ⁻¹¹	5X10 ⁻⁹	5x10 ⁻⁸	2.5x10 ⁻⁹
Lys-bk	1X10 ⁻⁹	2X10 ⁻⁸	-	7.3x10 ⁻¹⁰
Des-Arg ⁹	1X10 ⁻⁶ inactivo	1X10 ⁻⁶ inactivo	1x10 ⁻⁶ inactivo	1.2x10 ⁻⁴

- Eggerickx y cols. (1992)
- García Sáinz y Avendaño (1999)
- Reyes y cols. (2000)

TABLA 1. TABLA COMPARATIVA DEL EFECTO DE DIFERENTES AGONISTAS DEL RECEPTOR DE BRADICININA EN LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

En esta tabla se muestran las K₅₀ (M) de activación de agonistas en el receptor a Bradicnina de humano tipo B2 expresado en diferentes tipos celulares, utilizando la técnica de movilización de calcio intracelular. Con letras oscuras se observan los datos obtenidos en el presente estudio.

Los resultados obtenidos con los antagonistas en el presente trabajo también fueron comparados con estudios previos realizados en otras líneas celulares. Los datos se muestran en la tabla 2, donde se observa que Hoe 140, el antagonista más potente en este estudio, resultó ser menos potente al compararlo con trabajos realizados en otras líneas celulares (CHO y C9), en los cuales obtuvieron K_{i50} a concentraciones en el orden pM, mientras en este estudio la K_{i50} obtenida fue de 160 nM.

El antagonista Nα- adamantaneacetyl-D-Arg[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe]-Bk fue inactivo a la dosis de 50 μM, a diferencia de un estudio realizado en la misma línea celular en el cual reportaron una inhibición total a la dosis 10μM (Reyes y cols.,

2000) por otro lado en un trabajo realizado en células C9 reportaron una K_{i50} = 20 μ M para este antagonista.

Finalmente el antagonista Des-Arg-[Leu⁵]-Bk, específico para el receptor tipo B1 a Bradicinina, al igual que en los trabajos revisados en la tabla comparativa no mostró inhibición alguna sobre el efecto de Bradicinina.

K_{i50}

Células \ Antagonistas	CHO •	C9 ••	SF21 •••	SF21
Hoe 140	1×10^{-8}	1×10^{-9}	-	1×10^{-7}
N α -adamantaneacetyl-D-arg[Hyp ³ , Thr ^{5,8} , D-Phe ⁷]-Bk	1×10^{-5}	2×10^{-4}	1×10^{-5} bloqueo total	5×10^{-5} inactivo
Des-Arg ⁹ [Leu ⁸]-Bk	Inactivo	1×10^{-6} inactivo	-	5×10^{-5} inactivo

- Eggerickx y cols. (1992)
- García Sáinz y Avendaño (1999)
- Reyes y cols. (2000)

TABLA 2. TABLA COMPARATIVA DEL EFECTO DE DIFERENTES ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR DE BRADICININA EN LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.

Tabla comparativa que muestra las K_{i50} (M) de activación de antagonistas en el receptor a Bradicinina tipo B2 de humano expresado en diferentes tipos celulares, utilizando la técnica de registro de movilización de calcio intracelular. En letras oscuras se observan los datos obtenidos en el presente estudio.

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron las propiedades farmacológicas del receptor humano a Bradicinina tipo B2 expresado en células de insecto sf21 mediante el sistema de baculovirus.

La activación de los receptores a Bradicinina involucra la vía de transducción de señales acopladas a la fosfolipasa C (PLC), la cual provoca un incremento en la producción de DAG e IP3, este último promueve cambios en la concentración intracelular de calcio.

El efecto de los agonistas y antagonistas sobre el receptor fue evaluado a través de la cuantificación de la movilización de calcio intracelular. Para este fin, el indicador de calcio: fura 2-AM fue una importante herramienta que nos permitió detectar cambios en la concentración intracelular de calcio libre.

La adición de 100 nM de Bradicinina, agonista natural del receptor, provocó un incremento inmediato de calcio intracelular, y la adición previa de EGTA disminuyó esta respuesta más del 50%, evento que nos sugiere que la respuesta promovida por Bradicinina es debida a dos mecanismos: el primero involucra la salida de calcio de pozas intracelulares y el segundo se debe a la entrada del calcio del medio extracelular, este comportamiento de tipo bifásico ha sido previamente reportado (Abd Alla y cols., 1996).

La activación del receptor por Bradicinina resulta en el incremento de la concentración de calcio intracelular de manera dosis dependiente, respuesta que se satura con 100 nM del agonista, el cual mostró una constante de activación media (K_{50}) de 2.6 nM.

De igual manera, Lys-Bk promovió la movilización de calcio intracelular de manera dosis dependiente, alcanzando su saturación con 10 nM del agonista y presentó una $K_{50} = 0.74$ nM.

El agonista específico para receptores tipo B1 Des-Arg⁹ (Dray y Perkins, 1993), también promovió movilización de calcio intracelular, mostrando ser un agonista débil para el receptor tipo B2 en este trabajo ($K_{50} = 127 \mu\text{M}$), la saturación se obtuvo con la concentración máxima aplicada (400 μM).

Las dosis máximas aplicadas de los agonistas: Bradicینina, Lys-Bk y Des-Arg⁹, movilizan diferentes concentraciones de calcio intracelular: Bradicینina promueve un 87% de la movilización de calcio intracelular con respecto al 100% promovido por Lys-Bk, mientras que Des-Arg⁹ promueve sólo un 67%.

Se observó una relación aparente entre las dosis máximas saturantes utilizadas para cada agonista y su capacidad de movilización de calcio intracelular, en la cual el agonista más débil en este estudio (Des-Arg⁹), necesita una dosis mayor (del orden μM), para activar al receptor, movilizandو una menor concentración de calcio intracelular, mientras que el agonista más potente (Lys-Bk), moviliza una mayor concentración de calcio intracelular a dosis menores (del orden nM). Lo anterior indica que cada cinina es capaz de movilizar diferentes niveles de calcio intracelular, lo que podría sugerir un papel diferencial en eventos fisiológicos y patológicos mediados por este receptor.

Las constantes de activación media obtenidas en este trabajo fueron comparadas con estudios previos. De esta comparación Bradicینina resultó 10 veces más potente para activar al receptor tipo B2 que en un estudio previo realizado en células Sf21, en el cual se siguió la misma metodología (Reyes y cols., 2000).

Por otro lado, el resultado obtenido con Bradicینina fue similar a un trabajo previo realizados en células C9, (García-Sáinz y Avendaño, 1999), donde el receptor es endógeno.

Sin embargo, la Bradicینina fue 10 veces menos potente para activar al receptor tipo B2 en este estudio que en un trabajo previo en células CHO (Eggerickx y cols., 1992).

Para el caso del agonista Lys-Bk, éste fue entre 10 y 100 veces más potente con respecto a trabajos realizados con células CHO (Eggerickx y cols., 1992) y células C9 (García- Sáinz y Avendaño, 1999).

El agonista Des-Arg⁹, que presenta una gran afinidad por el receptor tipo B1 a Bradicینina (Dray y Perkins, 1993), mostró características de agonista para el receptor tipo B2, a diferencia de lo reportado en trabajos realizados en los tipos

celulares CHO (Eggerickx y cols., 1992), Sf21 (Reyes y cols., 2000) y C9 (García – Sáinz y Avendaño., 1999), estudios en los que no detectaron movilización de calcio intracelular a concentraciones μM .

En lo que respecta a los resultados obtenidos con los antagonistas, Hoe-140 fue entre 10 y 100 veces más débil para inhibir la respuesta promovida por Bradicinina en comparación con un estudio realizado en células CHO (Eggerickx y cols., 1992), C9 (García- Sainz y Avendaño, 1999) y Sf21 (Reyes y cols., 2000).

El otro antagonista específico para el receptor tipo B2 a Bradicinina, $\text{N}\alpha$ -adamantaneacetyl-D-arg Hyp³, Thi^{5,8}, D- Phe⁷-Bk, no tuvo actividad en nuestro estudio para abatir la respuesta promovida por Bradicinina, a diferencia de estudios realizados en células CHO (Eggerickx y cols. 1992), C9 (García-Sáinz y Avendaño, 1999) y Sf21 (Reyes y cols., 2000).

Finalmente, Des-Arg-Leu⁸ antagonista específico para el receptor tipo B1 a Bradicinina no modificó la movilización de calcio promovida por Bradicinina, y en cambio, se comportó como agonista parcial.

De la comparación de nuestros resultados con estudios previos realizados en otros tipos celulares, podemos concluir que los agonistas probados en este estudio se comportaron de manera más potente que los antagonistas, para el receptor tipo B2 expresado en células de insecto.

Estas diferencias podrían deberse a la actividad espontánea intrínseca del receptor, concepto introducido en un trabajo reciente (Fathy y cols.,1999). En el estudio mencionado realizaron mutagénesis dirigida de serinas y treoninas, aminoácidos involucrados en el proceso de desensibilización por el ligando del receptor a Bradicinina tipo B2 de humano. Fathy y colaboradores (1999), muestran que el receptor presenta una actividad intrínseca que modula el comportamiento de un fármaco ya sea como agonista inverso, agonista parcial o antagonista. Además proponen que la capacidad de una droga para modular una respuesta también esta determinada por las características del medio ambiente celular, como serían las diferentes condiciones de cultivo en que las células fueron crecidas.

Estos argumentos podrían ayudarnos a explicar las diferencias de comportamiento encontradas en la comparación de agonistas y antagonistas en

este trabajo con estudios realizados en otros tipos celulares e incluso en el mismo tipo celular.

De ser así, una de las causas de discrepancia en la comparación de resultados, serían las condiciones del medio ambiente celular en que se realizó cada trabajo, las cuales son específicas y diversas e influirían directamente en el comportamiento del receptor.

De esta manera, sería el estado intrínseco en que se encuentre el receptor lo que determinaría la manera en que el fármaco aplicado actúe: como un agonista inverso, un agonista parcial o incluso como antagonista. Como es el caso observado en este trabajo con $N\alpha$ -adamantaneacetyl-D-arg Hyp³, Thi^{5,8}, D- Phe⁷-Bk, antagonista específico para el receptor tipo B2 que actuó como un agonista parcial.

En términos generales, el receptor tipo B2 de humano expresado en células de insecto fue capaz de acoplarse a las vías de señalización presentes en este tipo celular y además presentó características funcionales similares a las de los mismos receptores expresados en células de mamífero, por lo tanto consideramos que el sistema de insecto puede permitir un avance rápido en la caracterización de vías de transducción de señales acopladas al receptor de Bradicinina así como el diseño y prueba de agonistas y antagonistas más potentes y selectivos.

7. CONCLUSIONES

Se expresó el receptor tipo B2 de humano en células de insecto Sf21 mediante el método de baculovirus. Este receptor fue estimulado por cininas que provocaron un incremento en la concentración intracelular de calcio con las constantes de activación: Lys-Bk ($K_{50}= 0.73\text{nM}$), Bradicinina ($K_{50}= 2.57\text{nM}$) y Des-Arg⁹ ($K_{50}= 127\mu\text{M}$).

El antagonista Hoe-140 inhibió la respuesta de activación del receptor por Bradicinina con una $K_{i50}= 0.16 \mu\text{M}$. Los antagonistas N α -adamantaneacetyl-D-Arg[Hyp³, Thi^{5,8}, D-Phe]-Bk y Des-Arg-[Leu⁸]-Bk, no inhibieron la respuesta del receptor promovida por Bradicinina.

De la comparación de nuestros resultados con estudios del mismo receptor en otras líneas celulares podemos concluir que en términos generales el receptor en este estudio se comportó funcionalmente de manera similar a trabajos realizados en células de mamífero.

8. REFERENCIAS

Abd Alla S, Jamagin K, Muller-Esterl W, Quitterer U. (1996): The N- terminal amino group of (Tyr8) bradykinin is bound adjacent to analogous amino acids of the human and rat B2 receptor. *J Biol Chem* 271: 27382-7.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994): *Molecular biology of the cell*, 3a edición, Garland, cap. 15. 1294 p.

Austin CE, Foreman JC, Scadding GK. (1994): Reduction by HOE-140, the B2 kinin receptor antagonist, of antigen-induced nasal blockage. *Br J Pharmacol* 111: 969-971.

Baldwin J.M. (1993): The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J* 4: 1693-703.

Barnes PJ. (1992): Bradykinin and asthma. *Thorax* 47: 979-83.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992): Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80.

Bimbaumer L. (1992): Receptor to effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71: 1069-72.

Burch RM. (1990): G protein regulation of phospholipase A2: partial reconstruction of the system in cells. *Adv Exp Med Biol* 279: 185-95.

Clapham DE y Neer EJ. (1993): New roles for protein G beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* 365: 403-406.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

Dalemar LR, Ivy Jong YJ, Wilhelm B, Baenzinger NL. (1996): Protein kinases A and C rapidly modulate expression of human lung fibroblast B2 bradykinin receptor affinity forms. *Eur J Cell Biol* 69: 236-44.

Dray A y Perkins M. (1993): Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci* 16: 99-104.

Eggerickx D, Raspe E, Bertrand D, Vassart G y Parmentier M. (1992): Molecular cloning, functional expresión and pharmacological characterization of a human bradykinin B2 receptor gene *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1306-1313.

Farmer SG y Burch RM. (1992): Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *An Rev Pharmac Toxic* 32:511-536.

Fathy BD, Leeb T, Mathis AS Leeb-Lundberg FLM. (1999): Spontaneous human B2 bradykinin receptor activity determines the action of parcial agonists or inverse agonists. *J Biol Chem commun.* 29603-29607

García-Sáinz A.J.y Avendaño- Vázquez E. (1999): Activation of Bradykinin B2 receptors increases calcium entry and intracellular mobilization in C9 liver cells. *Mol Biol Int* 47: 927-933.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-3450.

Hall JM. (1992): Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *J Pharmac Ther* 56:131-190.

Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. (1992): Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 184: 260-8.

Menke GJ, Borkowski AJ, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick WA, Schneck AK, Ransom WR, Strader DC, Linemeyer LD, Hess FJ. (1994): Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269: 21583-21586.

Neer JE. (1995): Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.

O'Reilly DR, Miller LK y U.A. Luckow. (1992) *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. Freeman:New York.

Proud D, Reynolds CJ, MacGlashan D, Newball HH, Shulman ES y Lichtenstein L.M. (1985): Immunoglobulin E- mediated release of kininogenase from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis* 132: 405-408.

Regoli D y Barabe J. (1980): Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32:1-46.

Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, y Sawutz DG. (1994): Bradykinin receptor types and B₂ subtypes. *Life Sciences* 55 (10):735-749.

Reyes CG, Prado VJ, Müller-Esterl W, Vaca L. (2000): Regulation of the human bradykinin receptor expressed in sf21 insect cells: a possible role for tyrosine kinases. *J Cell Biochem* 76:658-673.

Salvino JM, Seoane PR, Douty BD, Awad MMA, Dolle RE, Houck WT, Faunce DM y Sawutz DG. (1993): Design of potent non-peptide competitive

antagonists of the human bradykinin B2 receptor J. Med Chem. 36:2583-2584.

Shenker A. (1995): G protein-coupled receptor structure and function: the impact of disease-causing mutations. Baillieres Clin Endocrinol Metab 9: 427-51.

Simon IM, Strathmann PM, Gautam N. (1991): Diversity of G proteins in signal transduction. Science 252: 802-807.

Steward JM. (1995): Bradykinin B2 receptor antagonists: development and applications. Can J Physiol Pharmacol 73: 787-90.

Tippmer S, Bossenmaier B, Haring H. (1996): Bradykinin induces tyrosine phosphorylation in human foreskin fibroblasts and 293 cells transfected with rat B2 kinin receptor. Eur J Biochem 236:953-9.

Watson S y Arkininstall S. (1994) The G protein linked receptor. 3a. edición. Academic Press.

ABREVIATURAS

AC	Enzima Adenilato Ciclasa.
AcMNPV	<i>Autografa californica</i> Virus Nuclear Poliédrico.
AMPc	Adenosin 5' Monofosfato Cíclico.
ATP	Adenosin Trifosfato.
CHO	Línea celular obtenida de ovario de hámster.
C9	Línea celular obtenida de células de hígado de rata.
DAG	Diacil Glicerol.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
DNAc	DNA complementario.
GDP	Guanosin 5' Difosfato.
GTP	Guanosin 5' Trifosfato.
Gi	Proteína G inhibitoria.
Gs	Proteína G estimuladora.
Gq	Proteína G activadora de la enzima fosfolipasa C.
IP ₃	Inositol Trifosfato
K ₅₀	Constante de activación media.
Ki ₅₀	Constante de inhibición media.
PLA	Enzima Fosfolipasa A
PLC	Enzima Fosfolipasa C.
PLD	Enzima Fosfolipasa D.
PKA	Proteína Cinasa A.
PKC	Proteína Cinasa C.
Sf 21	Línea celular del insecto <i>sporodoptera frugiperda</i> .

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Luis Vaca por darme la oportunidad de estar en su laboratorio y por brindarme su apoyo y paciencia.

A la Dra. Anaíd Antaramian por sus enseñanzas, tiempo, y sobre todo por ser una buena amiga.

A la Dra. Guadalupe Reyes ya que su trabajo fue de gran ayuda para la realización de esta tesis.

A Alicia Sampieri por la colaboración en la parte técnica de este trabajo

A todos mis compañeros de laboratorio, por su amistad y ayuda.

A mis sinodales M. En C. Octavio García González, Q. Sivestre Alavez Espidio, Biol. Leonardo Peraza, por sus oportunas observaciones y tiempo dedicado a esta tesis.

A la Fundación UNAM y a CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

A la UNAM por permitirme ver más allá de los horizontes.

Gracias a Verónica por insistir tanto en este trabajo a veces abandonado, por esas tardes en el laboratorio escuchando a Silvio, por las maravillosas pláticas de la ciencia y de la vida.

A Enrique por siempre escucharme, por tragarte mis historias porque aunque pase el tiempo siempre estás cerca... gracias por jalarme las orejas.

A Joaquín por ser tan importante en mi vida, por crecer juntos.

A Tarin, Lupita y Arturo por todos los recuerdos y presentes porque aunque lejos, siempre están en mi corazón.

A Ricardo por compartir conmigo un pedazo de tu vida.

A Cecilia por los momentos mágicos.

A Hugo por mantenerte cerca.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera estuvieron conmigo.