

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

03021
14

FACULTAD DE MEDICINA

EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR
 α_1 D-ADRENÉRGICO HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

PRESENTA:

CITLALI EKATERINA RODRÍGUEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. J. ADOLFO GARCÍA SÁINZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

1



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

LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
Instituto de Investigaciones Biomédicas
Coordinación de Enseñanza

Dr. José Narro Robles
Director de la
Facultad de Medicina
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Citlali Ekaterina

Rodríguez Pérez

FECHA: 13- Octubre - 2003

FIRMA: Citlali Ekaterina

Por medio del presente le informamos que la tesis: " Expresión estable y caracterización del receptor α 10-adrenérgico humano" que presenta la alumna: Citlali Ekaterina Rodríguez Pérez, reúne ampliamente los requisitos de una tesis de la Licenciatura en Investigación Biomédica Básica. Por lo tanto, los suscritos miembros del Jurado damos nuestro voto aprobatorio para que la tesis sea presentada en examen oral.

Atentamente.

Dr. Enrique Ortega Soto

Dr. J Adolfo García Sáinz

Dra. Marina Macías Silva

Dr. Carlos Rosales Ledezma

Dra. María Eugenia Torres Márquez

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo financiero de los donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (36230-N) y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN2051999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A los Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto de Fisiología de Celular y Facultad de Medicina.

A mis profesores durante la carrera por la trasmisión de su conocimiento y experiencia.

Al Dr. J. Adolfo García Sáinz por su asesoría, apoyo y confianza durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Teresa Romero Ávila por la enseñanza y ayuda técnica en la realización del trabajo.

A los integrantes de mi Jurado por la lectura y comentarios al trabajo: Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Carlos Rosales Ledezma y Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez.

A mis tutores y a sus grupos de investigación por su contribución a mi desarrollo personal y académico:

Al Dr. Mario Calcagno Montans y a Laura Álvarez.

A la Dra. Alicia González Manjarrez y a Lina Riego.

A la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia y a Carmen Sánchez .

A los Dr. Javier Espinosa y Mtra. Ada Méndez por estar siempre al tanto de los alumnos.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas Marta Cariño y Rebeca Ramírez por el apoyo bibliográfico.

A todos aquellos que han contribuido en mi formación académica y que en este momento sin querer omite.

A mi mamá Elba, por su apoyo incondicional.

A mi papá Hugo Sergio, que estaría muy orgulloso.

A mis abuelos Amelia, Masha y Chon, por ser luchadores incansables.

A mis tíos Yura, Elena y Tania.

A mis hermanos Yuri y Quetzalcoatl.

A Andrei Mitchel.

A todos mis amigos.

A Angélica, Maro, Ericka, Laura, Omar, Dzidzelia, Ana Maria, Miriam, Jessica y Yetzi

A mis compañeros de laboratorios:

Laura, Ismael, Gabi y Samuel; Lina, Cristy, Alexander, Amaranta, Luis Bernardo, Mauricio, Martín, Xitlali y Alejandra; Carmen, Román, Paz, Elena, Víctor, Ricardo, Raquel, Tanya y Pedro; Tere, Paty, Rocío, Eréndira, Tzindilú, Alejandro y Lupita Jiménez.

A mis compañeros de clase:

Ana Paulina, Alejandro, Andrea, Carlos, Eduardo, Fabián, Fabiola, Israel, Jessica, Julián, Julio, Miguel, Miriam, Richi, Ricardo, Yasmin, Yetzi.

*"Hay hombres que luchan un día
y son buenos, hay otros que luchan un año
y son mejores
hay quienes luchan muchos y son muy buenos
pero hay los que luchan toda la vida
esos son los imprescindibles"*

Bertolt Brecht

"El pasado ya no es, el futuro aún no es y el presente no es todo"

Jean-Paul Sartre

5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

Resumen

I y II. Introducción.....	1-23
I. Marco teórico-conceptual.....	1-21
I.1 Generalidades.....	1-3
I.2 Proteínas G.....	4-6
I.3 Catecolaminas.....	7-9
I.4 Receptores adrenérgicos α_1	10-11
I.4.1 Estructura.....	12-13
I.4.2 Mecanismo de la transducción de la señal.....	14-15
I.4.3 Farmacología.....	16-18
I.4.4 Regulación.....	19-21
II. Antecedentes.....	22-23
III. Objetivos.....	24
IV. Hipótesis.....	25
V. Material.....	25-26
VI. Metodología.....	27-32
VII. Resultados.....	33-44
VIII. Discusión.....	45-49
IX. Conclusiones.....	50
X. Bibliografía.....	51-58

ÍNDICE DE TABLAS y FÍGURAS

Marco teórico-conceptual

Figuras:	Páginas
I. Clasificación de receptores acoplados a proteínas G.....	3
II. Proteína G heterotrimerica.....	5
III. Biosíntesis de catecolaminas.....	9
IV. Estructura de los receptores adrenérgicos α_1	10
V. Sistema de fosfoinosítidos/calcio.....	15

Tablas:

I. Principales características de los receptores adrenérgicos α_1	11
II. Afinidades para los receptores adrenérgicos α_1	17

Resultados

Figuras:

1. Clonación del receptor adrenérgico humano.....	34
2. Efecto de la norepinefrina en la liberación de calcio intracelular.....	35
3. Curva dosis respuesta (3A) y trazos representativos (3B).....	36
4. Efecto del BMY7378 en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$	37
5. Efecto de la NE y BMY7378 en la producción de fosfatos de inositol...38	
6. Fotomarcage de los receptores adrenérgicos.....	39
7. Curva de saturación con tamsulosina.....	40
8. Desplazamiento de los agonistas.....	41
9. Desplazamiento con antagonistas.....	42
10. Efecto del TPA en la liberación de calcio.....	44
11. Efecto del TPA en la producción de fosfatos de inositol.....	44

Tablas:

1. Parámetros farmacológicos de los agonistas.....	41
2. Parámetros farmacológicos de los antagonistas.....	42

ABREVIATURAS

AMPC: Adenosín monofosfato cíclico
ATP: Adenosín trifosfato
Bmax: Sitios de unión
BMY7378: Antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_{1D}
CEC: Cloroetilclonidina
CTX: Tóxina del cólera
DAG: Diacilglicerol
GDP: Guanosín trifosfato
GMP: Guanosín monofosfato
GPCR: Receptores acoplados a proteínas G
GRK: Cinasa de receptores acoplados a proteínas G
IP₃: Inositol trifosfato
Kd: Constante de afinidad
Ki: Constante de inhibición
LB: Luria Bertani
LPA: Ácido Lifosfatídico
NE: Norepinefina
RA: Receptores Adrenérgicos
PI: Fosfoinositidos
PKA: Proteína Cinasa A
PKC: Proteína Cinasa C
PLC- β : Fosfolipasa C, isoforma β
PTX: Tóxina Pertussis
RGS: Reguladores de la señal de proteínas G
TPA: Tetradecanoil forbol acetato

RESUMEN

El objeto principal de esta tesis consistió en expresar establemente al receptor adrenérgico α_{1D} humano, así como caracterizarlo funcional y farmacológicamente.

Para ello, se utilizaron las células Rat-1 como modelo experimental, así mismo la introducción del receptor se realizó con la técnica de transfección por lipofectamina; a continuación se midió su respuesta a la producción de segundos mensajeros como parámetro de funcionalidad y se seleccionó la clona con mejor respuesta. La células con el receptor expresado presentaron estimulación por NE tanto en la liberación de calcio y en la producción de IP_3 , de igual forma fueron expuestas a BMY7378 (antagonista selectivo de los RA α_{1D}) observándose una disminución en la estimulación de NE. También se llevo a cabo la detección del receptor por fotomarcaje con [^{125}I] arilizado prazosina, encontrándose una banda de ~70kDa, correspondiente al peso molecular reportado.

La caracterización farmacológica se realizó con estudios de unión a un ligando radiactivo ([3H] tamsulosina) a través de dos tipos de experimentos: de *saturación*, por el que se obtuvo la afinidad de receptor con una K_d de 0.3nM y el número de receptores expresados ($B_{max}=40$ fmol/mg de proteína); y de *competencia por el sitio de unión*, determinándose las K_i y las curvas de desplazamiento para distintos fármacos, presentando el siguiente orden de afinidad: para agonistas, epinefrina \geq norepinefrina > oximetazolina > metoxamina y para antagonistas BMY7378 > 5-metil-urapidil \geq fentolamina. Por último, las células con el receptor expresado establemente fueron expuestas a TPA y se midió su efecto en la producción de segundos mensajeros con el fin de determinar la participación de PKC y tratar de establecer la regulación del mecanismo de señalización en este receptor.

De los experimentos y resultados se puede concluir que el receptor adrenérgico α_{1D} humano:

- Es expresado establemente en las células Rat-1, aunque en poca cantidad.
- Muestra un nivel basal alto.
- Se acopla al sistema de recambio de fosfoinositidos/calcio.
- Presenta alta afinidad por BMY7378, epinefrina y norepinefrina.
- Sufre de desensibilización por ligando y por PKC.

I y II. INTRODUCCIÓN

I.-MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

I.1 Generalidades

El funcionamiento y regulación de un organismo implica la participación de procesos complejos llevados a cabo adecuadamente en parte debido a la existencia de la **comunicación celular**, que emplea diferentes sistemas de transducción que le permiten tomar decisiones en determinados momentos. Esta comunicación puede ser de varios tipos: **endocrina u hormonal**, en la cual las glándulas de secreción interna vierten la hormona al torrente sanguíneo y ahí interactúan con las células blanco; **paracrina**, la cual se produce entre células cercanas; **autocrina**, en la que el producto liberado por una célula actúa sobre la misma célula; **sináptica o neurotrasmisión**, es la comunicación a través de las células nerviosas donde la información va de la célula presináptica a la postsináptica; **neuroendocrina**, una célula formada a partir de tejido nervioso secreta su mensaje a la circulación; y **yuxtacrina**, dada entre células adyacentes donde hay moléculas ancladas al lado externo de la superficie de una célula que hacen contacto con receptores localizados en la membrana de una célula contigua. (Alberts, et al., 1996; García, 1996)

Los **mensajeros químicos primarios**, como las hormonas son los primeros en actuar dentro de un sistema fisiológico al presentarse algún cambio extracelular. Las hormonas son de diferente naturaleza química (lipídica, péptidica o de amina), y viajan para desencadenar una serie de **señales** intracelulares a través de la activación de **receptores** u "oídos celulares", los cuales son moléculas sensoras que reciben, detectan y transmiten el mensaje al interior de la célula, produciendo así una determinada respuesta. (Alberts, et al., 1996; García, 1996; Norman, 1997)

El concepto de una sustancia receptora en los sistemas biológicos fue introducida por Langley alrededor de 1900 (revisado por García-Sáinz, 1995). El proceso de reconocimiento entre el receptor y el ligando es realizado por un

acoplamiento o proceso de transducción donde el receptor sufre un cambio conformacional. Después del evento de transducción de la señal, el ligando se disocia reversiblemente prosiguiendo a la inactivación o degradación de la hormona y del receptor (endocitosis). (Alberts, et al., 1996; Norman, 1997)

Los receptores pueden estar en el citosol o en la superficie membranal, clasificándose así en dos grandes grupos:

1. Los **receptores intracelulares**, cuyos ligandos son permeables a la membrana, tienen la particularidad que viajan al núcleo y presentan un sitio de unión a DNA. Entre ellos están los receptores a cortisol, hormonas sexuales y tiroideas, vitamina D y retinoides.
2. Los **receptores extracelulares o membranales** son de tres tipos de acuerdo a su forma de transmitir la señal:
 - a) **Receptores canal** (o canales iónicos activados por ligando). A este tipo pertenecen los receptores GABA y NMDA.
 - b) **Receptores con actividad enzimática**, los cuales a su vez se subdividen de acuerdo a su dominio de enzima principalmente:
 - Con *actividad cinasa*: que tienen la capacidad de ser fosforilados en residuos de serina/treonina o en residuos de serina/tirosina. En los primeros están los receptores del factor de crecimiento y transformante β (TGF- β) y entre los segundos receptores están los de insulina, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y derivado de plaquetas (PDGF).
 - Con *actividad guanilil ciclasa*: el receptor al factor natriurético pertenece a este grupo.
 - c) **Receptores acoplados a proteínas G** que son la clase más numerosa de receptores de superficie celular. Todos muestran una estructura de siete dominios transmembranales y se acoplan a proteínas G heterotrímicas. Estos receptores presentan baja similitud de secuencia entre una familia y otra. Se clasifican en tres familias (Fig.I): **Familia A** (o semejante a la rodopsina), es el más grande subtipo y contiene receptores para odorantes, catecolaminas y aminas, algunos péptidos y hormonas glicoproteicas. Los

receptores de esta familia se caracterizan por tener aminoácidos altamente conservados y un puente disulfuro que conecta la primera y la segunda asas extracelulares; la mayoría de los integrantes de la familia A, tienen cisteínas palmitoladas en el extremo carboxilo terminal. **Familia B.** Los receptores de esta familia se caracterizan por un extremo amino terminal relativamente largo que contiene varias cisteínas, las cuales forman una red de puentes disulfuro. Los ligandos de estos receptores incluyen hormonas como el glucagón, hormona liberadora de gonadotropina y hormona paratiroidea. **Familia C,** contiene receptores sensibles a Ca^{2+} , glutamato, metalotrópicos y ácido γ -aminobutírico (GABA). Estos receptores se caracterizan por tener los extremos amino y carboxilo largos. Los dominios de unión a ligando se localizan en el extremo amino terminal. La tercera asa intracelular es corta y altamente conservada. (George, et al., 2002)

La vía de señalización y tipo de regulación de los receptores acoplados a proteínas G dependerán del subtipo de proteína G implicada y del ligando de cada receptor, esto da origen a una respuesta biológica variada. Algunos de los mecanismos se mencionarán con mayor detalle a lo largo del texto, dedicándome más a los relacionados con los receptores adrenérgicos α_1 .

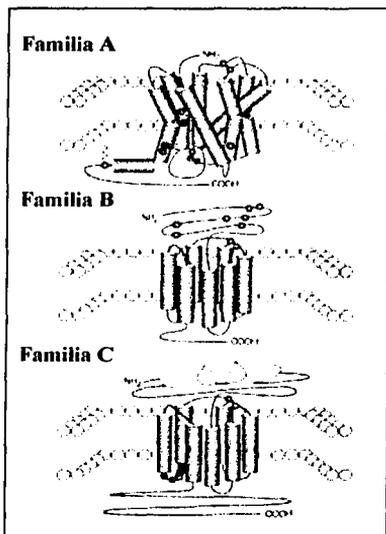


Figura 1. Clasificación de los receptores acoplados a proteínas G. Representación esquemática que muestra las principales características de las diferentes familias de este grupo. Familia A, caracterizada por tener aminoácidos altamente conservados (círculos rojos) y una cisteína palmitolada (zig-zag naranja). Familia B, se distinguen por tener un extremo amino largo con varias cisteínas (círculos rojos). Familia C, se caracterizan por tener los extremos amino y carboxilo relativamente grandes, además que el sitio de unión a ligando (ovalo café) está localizado extracelularmente dentro del extremo amino terminal. Tomado de George, et al, 2002.

I.2 Proteínas G

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por tres subunidades α , β y γ . Actúan como conectores que regulan el procesamiento de la información asociando a los receptores de la superficie celular con una variedad de efectores que amplifican las señales (canales iónicos y enzimas que generan moléculas reguladoras y segundos mensajeros). Las proteínas G también tienen un papel en la determinación de las características temporales y específicas realizando una variedad de funciones dependiendo del receptor y el ligando participante.

La subunidad α (39-46kDa) contiene dos dominios, uno involucrado en la unión e hidrólisis de GTP (dominio G) y otro dominio helicoidal que cubre al GTP en el centro de la proteína. La subunidad β (37kDa) tiene una estructura provista de 7 láminas β -plegadas. La subunidad γ (8kDa) interactúa con la subunidad β a través de un espiral enrollado en el amino terminal y entonces toda la base de β hace contacto. Las subunidades $\beta\gamma$ forman una unidad funcional que no es disociable excepto por desnaturalización (Hamm, 1998). El complejo $\beta\gamma$ es también un importante modulador de varias isoformas de PLC- β y adenil ciclasas, efectores que regulan la concentración intracelular de segundos mensajeros (fosfatos de inositol y AMPc, respectivamente, entre otros). La conformación espacial del heterotrímero y su relación con el receptor son visualizadas en la Fig. II.

La interacción de la proteína G con el receptor activado promueve el intercambio de GDP unido a la subunidad α por GTP, y la subsecuente disociación del complejo α -GTP del heterodímero $\beta\gamma$. (Melvin et al, 1991)

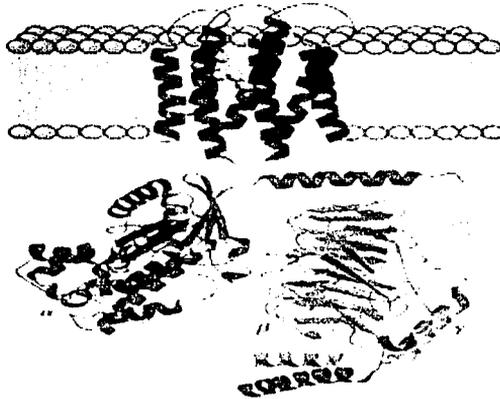


Figura. II. Esquematación de las subunidades α , β y γ de las proteínas G.
 Se observa la estructura e interacción del heterotrímero de la proteína G con un receptor membranal. (Ver texto)

La terminación de la señal ocurre cuando el GTP unido a la subunidad α es hidrolizado a GDP, y dicha subunidad entonces es reasociada al complejo $\beta\gamma$ y entra a un nuevo ciclo. El extremo amino terminal de algunas proteínas G tiene sitios de miristilación, lo cual aumenta la afinidad de la subunidad α por la subunidad $\beta\gamma$, facilitando la formación del heterotrímero. La cinética de este ciclo funcional no sólo es regulado por receptores sino también por efectores y proteínas regulatorias, las cuales aceleran o desaceleran la velocidad de la señalización a través del ciclo de la proteína G. (Neer,1995). Un solo receptor puede activar múltiples moléculas de proteína G, amplificando el evento de unión del ligando.

Se distinguen cuatro familias de proteínas G: Gi, que inhibe la adenilato ciclasa; Gs, la que estimula a la adenilato ciclasa; Gq, la cual activa a la PLC; y, G12 y G13. Existen muchos productos de genes para cada subunidad, para la α 20, β 6 y γ 12.

La subunidad α tiene además de un sitio de actividad GTPasa y un sitio de ADP ribosilación dependiente de NAD^+ catalizada por toxinas bacteriales, PTX (toxina Pertussis) y CTX (toxina del cólera), estas toxinas se han utilizado para identificar el tipo de proteína G: Gs es ADP ribosilada por CTX, las Gi y Go son ADP ribosiladas por PTX, y la Gt por ambas toxinas. (Melvin, et al, 1991)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I.3 Catecolaminas

Las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, son sintetizadas y liberadas por neuronas adrenérgicas. Las catecolaminas pueden participar en la comunicación neuronal (sistema nervioso) u hormonal (médula suprarrenal).

Las catecolaminas actúan a través de receptores membranales (adrenérgicos) que pueden producir acciones muy variadas. La diversidad de respuestas son generadas por la unión del ligando a diferentes tipos de receptores.

Las respuestas iniciales en varios tejidos son:

- Incremento en glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado.
- Efecto inotrópico y cronotrópico en el corazón.
- Secreción de amilasa por la glándula salival.
- Relajación de la musculatura uterina.
- Incrementa la conversión de triglicéridos a ácidos grasos y del glicerol en el tejido adiposo.
- Elevación de la presión sanguínea.
- Dilatación de la musculatura bronquial.

La **médula suprarrenal** es un cuerpo celular que ha sido adaptado para la función secretora. La médula está hecha de neuronas modificadas que no poseen axones largos o terminaciones nerviosas. Las hormonas liberadas de las células cromafinas (neuronas simpáticas posgangliónicas modificadas) se unen a receptores en los hepatocitos y producen una ruptura del glucógeno a glucosa, la cual pasa a la circulación para usarse como una fuente de combustible. Otras hormonas liberadas se unen también a los receptores adrenérgicos produciendo cambios en la presión sanguínea y en la función del corazón. Las catecolaminas de neuronas posgangliónicas forman sinápsis con un órgano o tejido efector, mientras que las cromafinas liberan directamente dentro de la circulación sanguínea. Las

células cromafinas poseen gránulos que almacenan catecolaminas; estas células también se encuentran en el ovario, riñón, testículo, hígado, corazón y tracto gastrointestinal. Las principales células blanco para la acción de la epinefrina son del hígado y de la musculatura vascular.

Síntesis de catecolaminas

La síntesis de catecolaminas se realiza en la célula cromafin: La tirosina o fenilalanina entran a la célula vía la circulación sanguínea y el fluido extracelular. En el citosol la tirosina es convertida por la tirosina hidroxilasa a hidroxifenilalanina (dopa). Esta enzima es el paso limitante en la síntesis de catecolaminas en todas las neuronas adrenérgicas. La l-dopa es convertida a dopamina por la l-amino ácido carboxilasa. A continuación la dopamina entra al gránulo neurosecretor donde se convierte en norepinefrina. La norepinefrina formada dentro del gránulo debe salir para convertirse en epinefrina por la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). La epinefrina en el citosol es regresada al gránulo y es guardado ahí hasta la secreción (Fig.III). (Norman y Litwack, 1997)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

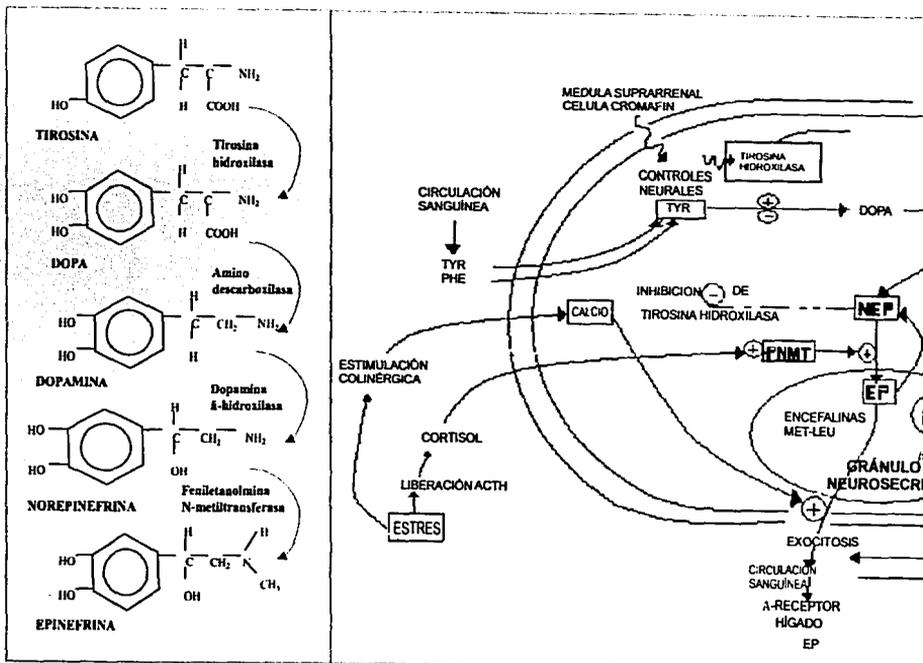


Fig.III. Biosíntesis, empaquetamiento y liberación de la Norepinefrina. En el recuadro de la izquierda se muestran las reacciones químicas de síntesis desde la tirosina hasta la formación en NE y EP. Y en el recuadro de la derecha, se observa la biosíntesis, empaquetamiento y liberación de la NE del gránulo neurosecretor en una situación de estrés.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

I.4 Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G que median las acciones de las catecolaminas: epinefrina y norepinefrina. Los receptores adrenérgicos están clasificados de acuerdo a su estructura (secuencia de aminoácidos), su farmacología (afinidad por agonistas y antagonistas) y a su mecanismo de acción (producción de segundos mensajeros) en tres familias. Cada familia se divide en tres subtipos cada una: α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} y α_{2C}) y β (β_1 , β_2 y β_3). La homología en secuencia y características estructurales similares sugieren que estos receptores están relacionados evolutivamente, originándose de un gen ancestral común y que subsecuentemente divergieron por duplicación genética para crear los distintos efectos de las catecolaminas. En ésta tesis se hará énfasis en los receptores α_1 y en especial a los α_{1D} . En la Tabla I se muestran las principales características de los receptores adrenérgicos α_1 .

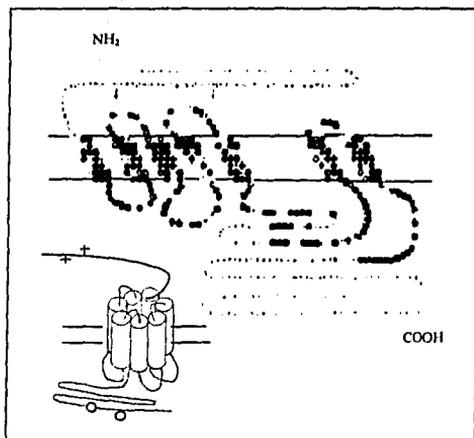


Figura IV. Estructura general de los receptores adrenérgicos α_1 .

Esquema y figura de las siete regiones transmembranales impregnadas en la membrana plasmática. Se observan las aspas citoplásmicas, la región extracelular (NH_2) y asa intracelular (COOH); los sitios de glicosilación, representados por las cruces. En el extremo carboxilo terminal hay sitios potenciales de fosforilación.

Características	Subtipo de Receptor		
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Nombre anterior	α_{1C}	α_{1B}	$\alpha_{1A}, \alpha_{1VD}$
Clonación realizada en:	humana, rata, ratón, perro, conejo, bovino, cobayo, cerdo	humano, hamster, rata, ratón y cobayo	humano, rata, ratón cerdo y conejo
Peso molecular	-	80kDa	65kDa
Proteína (amino ácidos)	465 (rata) 466 (humano)	515 (rata) 519 (humano)	560 (rata) 572 (humano)
Sitios de glicosilación	3	4	2
Sitios de fosforilación	PKA	PKA, PKC	PKC
Proteína G de acoplamiento	Gq/11/14	Gq/11/14/16, Gh	Gq/11
Organización genómica			
Intrones	1	1	1
Exones	2	2	2
Localización cromosomal	8	5	20
Tejido prototipo	corazón e hígado humano, uretra, vas deferens, vasculatura y glándula submaxilar en rata	hígado, bazo y corazón (rata)	arterias femoral e ilíaca, aorta, pulmón y corteza cerebral (rata)
Localización celular	superficie e interior celular	superficie celular	mayoritariamente intracelular
Selectividad farmacológica			
Agonista (Epinefrina para todos)	Oximetazolina; (+)nigudipina;	AH1111A	(+)Norepinefrina
Antagonista	KMD-3213	-	BMY7378
Susceptibilidad (grado) a modificación covalente			
CEC	+	+++	-+
SZL-49	+++	+	-
Azidoprasozina	ND	+++	-

Tabla I. Principales características de los receptores α_1 adrenérgicos. (Tomado de Graham et al, 1996; Docherty, 1998; Piascik y Perez, 2001)

I.4.1 Estructura

El análisis de hidropatía de la secuencia de aminoácidos de los receptores adrenérgicos α_1 indica que hay siete agrupamientos hidrofóbicos de 20-25 residuos cada uno separados por trechos de residuos hidrofílicos. Ambos tipos de residuos son regiones conservadas en los receptores acoplados a proteínas G. La secuencia de aminoácidos en los receptores adrenérgicos es de 466-561 y de la estructura primaria el peso molecular deducido es de 37-45 kDa, aunque varía entre el deducido y el observado como resultado de las modificaciones postranscripcionales. Estas modificaciones incluyen la adición de polisacáridos y/o tioesterificación de ácidos grasos (palmitico o mirístico) o por fosforilación. La estructura general de los receptores se muestra en la Fig. IV.

El *extremo amino terminal* está localizado extracelularmente, contiene sitios consenso de glicosilación ligados a asparagina, y varía considerablemente en tamaño entre un receptor y otro. El receptor más largo con unos 90 aminoácidos es el α_{1D} , seguido por el α_{1B} con 42 y 25 para el α_{1A} . El *extremo carboxilo terminal* está localizado intracelularmente y contiene sitios consenso para fosforilación de cinasas de serina/treonina como la PKC. La modificación en estos sitios está involucrada en la desensibilización del receptor. La región carboxilo muestra poca homología entre los subtipos, sin embargo contiene un residuo conservado de cisteína, aproximadamente 16 aminoácidos al final del séptimo espacio transmembranal.

Las *regiones transmembranales* están unidas por tres asas intracelulares y tres extracelulares. Estas asas aunque son variables en tamaño son similares entre los subtipos de receptores. La primera y la segunda asas extracelulares contienen una cisteína cada una, muy conservada entre los receptores a proteínas G. La tercera asa citoplásmica de los α_1 es intermedia en tamaño entre los β y los α_2 . Entre los receptores adrenérgicos la identidad en los dominios transmembranales



entre los subtipos del mismo grupo es de 70-80%, y entre subtipos de diferentes grupos es de 30-40%. (Lomasney, 1991).

Evidencia experimental con receptores quiméricos sugiere que el *sitio de unión* específico para cada subtipo se encuentra determinado por el séptimo dominio transmembranal. Otros estudios sugieren que este dominio puede ser esencial para dar dirección apropiada al enrollamiento del cesto de unión; una vez formado el cesto, el séptimo dominio puede ser removido proteolíticamente sin afectar la unión del ligando.

Varios *dominios citosólicos* están involucrados en el acoplamiento funcional de los receptores y proteínas G. El tercero es responsable de determinar la especificidad de las interacciones receptor-proteína G así como de las regiones de la segunda asa intracelular. Dominios específicos del receptor pueden directamente activar a proteínas G. En el estado no ocupado estos dominios pueden estar ocultos de la proteína G por otros dominios del receptor. Cambios conformacionales inducidos por la unión del agonista probablemente hacen a estos dominios accesibles a la proteína G. (Kobilka, 1992)

Hay tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 codificados por tres genes. Cada uno de los tres genes de los subtipos consiste de dos exones y un intrón de 14 a 20 aminoácidos, que interrumpen la región codificante al final del sexto dominio transmembranal. En todos el límite exon/intron está situado después de la primera base del codón indicando una fase de empalme (splice) tipo 1. Esta organización genómica es única entre los receptores acoplados a proteína G. (Graham, et al, 1996)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.4.2 Mecanismos de transducción de la señal

Sistema de Fosfoinosítidos/Calcio

El mecanismo de acción de los receptores adrenérgicos α_1 es a través del acoplamiento con $G_{q/11}$ lo que activa una PLC- β que inicia la hidrólisis de fosfatidil inositol bifosfato, un fosfolípido localizado en la membrana plasmática produciendo dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) el que a su vez estimula a PKC (proteín cinasa C) e IP_3 (inositol trifosfato), este último interactúa con un receptor intracelular del retículo endoplásmico con la concomitante liberación de calcio intracelular (Fig.V). La acción del IP_3 es altamente cooperativa y se sugiere que se necesitan tres moléculas para abrir el canal de calcio. Una característica de los receptores de IP_3 es que no se desensibilizan.

En el metabolismo del $Ins1,4,5P_3$ (IP_3) están implicadas dos vías. Una es la desfosforilación secuencial hasta inositol libre. El primer paso es llevado a cabo por una trifosfatasa de inositol que esencialmente remueve el fosfato de la posición 5, el cual sirve para terminar la acción movilizante del calcio por $Ins1,4,5P_3$ debido a que el producto $Ins1,4P_2$ es incapaz de liberar calcio. La otra vía, empieza con una cinasa que fosforila $Ins1,3,4P_3$ en la posición 3 dando $Ins1,3,4,5P_4$, éste es entonces desfosforilado a $Ins1,3,4P_3$ removiendo específicamente el fosfato de la posición 5, aparentemente por la misma enzima que hidroliza $Ins1,4,5P_3$. El $Ins1,3,4P_3$ es entonces desfosforilado a $Ins3,4P_2$ y a su vez en $Ins1,3P_2$.

El diacilglicerol permanece en la membrana y subsecuentemente es hidrolizado por una DAG lipasa liberando ácido araquidónico o puede ser fosforilado a ácido fosfatídico por una DAG cinasa. El recambio de fosfoinosítidos está directamente acoplado a la activación de PKC. Esta familia de enzimas juegan papeles de crucial importancia en la transmisión de la información de un gran número de mensajeros extracelulares ya que regulan una serie de procesos

celulares que incluyen metabolismo, secreción, contracción, actividad neural y proliferación celular, entre otros. (Berridge, 1987)

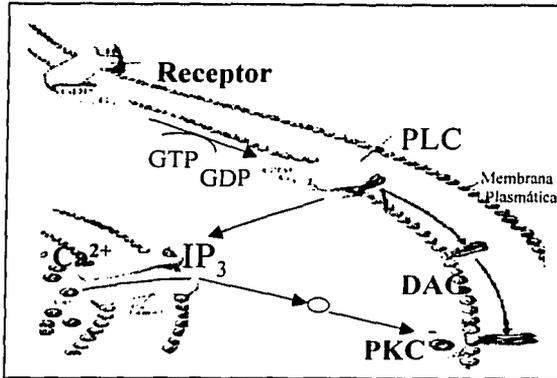


Figura V. Sistema Fosfoinosítidos-Calcio.

Se describe un sistema donde la señal causa la activación del receptor, el receptor se vuelve activo y estimula a la PLC (fosfolipasa C), esta a su vez convierte al fosfatidil inositol en IP_3 y DAG (diacil glicerol). IP_3 causa la liberación de calcio intracelular del retículo endoplásmico y junto con el calcio y DAG activan PKC

Sistema del AMPc

La adrenalina funciona como un modulador del nivel de AMPc, esto es a través de los receptores adrenérgicos α_2 de manera inhibitoria y de los β de forma estimulatoria de la síntesis. La misma catecolamina puede dar efectos contrarios dependiendo de la proteína G que se acople a la adenil ciclasa. G_i (inhibitoria) o G_s (estimulatoria). En el efecto inhibitorio tanto las subunidades α_i como las $\beta\gamma$ contribuyen a la inhibición de la adenil ciclasa, las α de manera directa y $\beta\gamma$ ya sea directamente uniéndose a la ciclasa e indirectamente uniéndose a algunas subunidades α_i libres así impide que estas activen moléculas de adenil ciclasa (Bylund, 1988).

I.4.3 Farmacología

Dos tipos de criterios farmacológicos se han usado para diferenciar y clasificar a los subtipos de receptores adrenérgicos α_1 : El primero es de acuerdo con la afinidad a fármacos que actúan competitivamente y el segundo es por la sensibilidad del efecto alquilante de cloroetilclonidina. El conocimiento de las propiedades farmacológicas ha permitido reconocer que existe heterogeneidad de receptores α_1 en tejidos y en especies, y que más de un tipo de población puede coexistir.

De tal manera que se han identificado agonistas y antagonistas selectivos para cada subtipo: metoxamina y WB4101 para el α_{1A} ; AH1110 y ciclazosina para el α_{1B} ; noradrenalina y BMY7378 para el α_{1D} . El receptor α_{1B} es el que mayor sensibilidad tiene a la cloroetilclonidina, seguido por los α_{1D} y α_{1A} (Michel, et al, 1995). Además de estos fármacos se han identificado otros como el 5-metilurapidil y la niguldipina, antagonistas para los α_{1A} teniendo una selectividad de 80-500 veces más sobre el α_{1B} , y muy baja afinidad por el α_{1D} . La tamsulosina tiene una alta selectividad por los α_{1A} seguida por el α_{1D} , la mayoría de la imidazolininas incluyendo a oximetazolina presentan mayor afinidad por el α_{1A} . Las catecolaminas muestran una afinidad de 20 veces mayor por el α_{1D} que sobre los otros dos subtipos de receptores (Zhong y Minneman, 1999). En la Tabla II se muestra el orden de potencia para algunos fármacos selectivos de los receptores adrenérgicos α_1 .

La unión del agonista envuelve a residuos transmembranales a lo largo de los dominios tres a seis, localizados hacia el interior del receptor a diferencia de los antagonistas en los que los residuos de unión dan hacia la superficie extracelular (Ishiguro, et al, 2002).

Fármaco	Subtipo		
	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
5-metil urapidil	8.63±0.32	6.97±0.50	7.31±0.66
metoxamina	4.29±0.75	3.36±0.67	4.33±0.61
(+)nigudipina	8.57±1.12	6.84±0.75	6.55±0.43
noradrenalina	5.0±0.54	5.35±0.42	6.55±0.43
oximetazolina	7.53±0.43	6.5±0.48	5.81±0.51
fentolamina	8.17±0.49	7.2±0.36	7.48±0.42
prasozina	9.52±0.38	9.79±0.38	9.63±0.4
WB4101	9.32±0.32	8.01±0.44	8.83±0.4

Tabla.II. Afinidades para los receptores α_1 adrenérgicos. Se muestran los valores de las K_D para cada subtipo, son el promedio \pm D.E. de varios experimentos en diferentes especies. (Tomada de Michel et al., 1994)

Interacción Receptor-ligando

Las características farmacológicas de los receptores adrenérgicos se han obtenido de ensayos de unión a un ligando marcado radiactivamente, en los que se cuantifican la interacción receptor-fármaco y su respuesta biológica. La interacción debe presentar las siguientes propiedades: especificidad, afinidad alta, saturabilidad, y una respuesta fisiológica

En estos experimentos se observa la relación de la concentración de un fármaco (agonista o antagonista) con la manifestación de una respuesta fisiológica, al ir aumentando la cantidad de fármaco hasta llegar a una dosis en la que no aumenta la respuesta. Tal comportamiento se describe mediante una curva

hiperbólica. La asíntota a la meseta de esta curva muestra que se han saturado el número de receptores disponibles. Además se puede calcular la K_d que es equivalente a la concentración de ligando en la cual se ocupa el 50% de sitios de unión totales, por lo que es un parámetro de afinidad. También se puede determinar la B_{max} que indica la concentración total de sitios receptores, y está representada por el intercepto del eje de las abscisas. Al analizar los datos de los gráficos de Rosenthal o Scatchard, que son la transformación lineal de la hipérbola, uno puede determinar estos parámetros y también si existe más de una población de receptores. (Attie y Raines, 1995)

La afinidad de los diferentes ligandos por el receptor se obtiene al realizar experimentos de competencia. Los agonistas se unen con afinidad alta y generan una respuesta similar a el ligando endógeno; los antagonistas se unen al receptor pero actúan inhibiendo o disminuyendo el efecto del agonista. Los antagonistas pueden ser competitivos o no competitivos. En este tipo de experimentos se mantiene una concentración fija del ligando marcado radiactivamente y se van variando las concentraciones de los fármacos (sin marca). El efecto farmacológico es representado generalmente por una curva dosis-respuesta, en la que al incrementar la dosis progresivamente aumenta el efecto, tiene una forma sigmoide al utilizar la escala logarítmica, y de ella se pueden determinar los siguientes parámetros:

- Eficacia: Respuesta máxima que produce un fármaco.
- Potencia: Actividad de un fármaco por cierta dosis, se expresa en función de la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la respuesta máxima, en el caso de agonistas y la concentración necesaria para bloquear el 50% de la respuesta en el caso de los antagonistas.
- Pendiente: Es la parte media de la curva dosis respuesta, representa la gradación de los efectos del fármaco entre la dosis máxima y mínima que produce el efecto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.4.4 Regulación

Desde el estímulo del receptor hasta el desencadenamiento de la respuesta, el receptor sufre una serie de cambios que regulan su función y modulan la eficiencia de la transducción de la señal tales como la internalización, reciclamiento, degradación y cambio en el número de receptores. En estos procesos la fosforilación tiene un papel importante y esta asociada a la señalización de “apagado” o desensibilización; y la desfosforilación se asocia con la resensibilización de los receptores acoplados a proteínas G (Lefkowitz, et al 1998; García-Sáinz, et al, 2000).

La **desensibilización** es un mecanismo adaptativo en los sistemas biológicos a través de la cual se reduce la respuesta de la célula a sucesivos estímulos. Este mecanismo es detectado después del estímulo hormonal y generalmente está mediada por la **fosforilación** del receptor, la cual es llevada a cabo por diferentes cinasas que actúan de manera secuencial. La movilización de las cinasas es relevante en la regulación del sistema. Después de la fosforilación el receptor sufre el desacoplamiento de la proteína G, y su función es atenuada o abatida (Loshe, 1995).

Los procesos mencionados presentan cierta velocidad, grado de atenuación y duración. Los pasos iniciales se llevan a cabo en segundos a minutos y requieren de la unión de proteínas adaptadoras al receptor fosforilado, el receptor es entonces sequestrado o internalizado. La internalización se realiza en un lapso de minutos a horas, en un compartimento intracelular lo que permite la desfosforilación por fosfatasa específicas. La resensibilización del receptor ocurre cuando regresa a la superficie celular, pero si la estimulación es persistente el receptor es regulado a la baja “down regulado” (degradación de la proteína y reducción RNAm) o sea hay una disminución en el número total de receptores. (Bunemann, et al, 1999)

Existen dos formas de desensibilización rápida: una específica de agonista u homóloga y la otra heteróloga o no específica de agonista.

La **desensibilización homóloga**, sucede cuando un receptor es activado por su agonista lo que desensibiliza la subsecuente respuesta del mismo receptor con ningún efecto en otro sistema receptor de la misma célula. Este tipo de desensibilización la participación de las cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) y las arrestinas son determinantes.

Las **GRKs** son una familia de siete cinasas de serina/treonina que fosforilan a los receptores acoplados a proteínas G (un tipo de ellas puede fosforilar a distintos receptores de esta familia) en estos residuos sólo cuando se encuentran unidos con el agonista, probablemente debido a que los sitios de fosforilación quedan expuestos como consecuencia del cambio conformacional que adoptan. Cada GRK muestra una organización funcional similar, con un dominio catalítico, una región carboxilo que contribuye a la señalización de la cinasa a la membrana plasmática, y un extremo amino terminal que es importante en el reconocimiento del receptor y que a su vez contiene un dominio semejante a RGS (reguladores de la señal de proteínas G). Esta familia está subdividida en tres grupos basados en su secuencia y función: 1) GRK1 (cinasa de rodopsina), GRK7 (cinasa opsina); 2) GRK2 (cinasa 1 del receptor β -adrenérgico), GRK3 (cinasa 2 del receptor β -adrenérgico); y 3) GRK4, GRK5, GRK6 (Ferguson, 2001). Estas enzimas al fosforilar a los receptores incrementan la afinidad del receptor por las arrestinas (Krupnic, 1998).

Las **arrestinas** contribuyen a la desensibilización ya sea desacoplando directamente al receptor o por endocitosis. La unión de las arrestinas a moléculas de clatrina inicia la internalización del receptor fosforilado dentro de vesículas. La dinamina es una GTPasa que regula la formación e internalización de vesículas cubiertas de clatrina; es esencial para el secuestro promovido por agonista de algunos receptores a proteínas G como el β_2 adrenérgico. Existen por lo menos dos vías endocíticas que tienen diferentes requerimientos para arrestinas y dinaminas.

Los elementos estructurales que contribuyen a la unión de las arrestinas incluyen: 1) una región ácida, localizada en el extremo carboxilo terminal, que

controla el reconocimiento de la forma fosforilada y activa del receptor, sin participar directamente con éste; 2) una región básica ubicada en el amino terminal, participa directamente en la interacción con el receptor y tiene un papel regulador por medio de la interacción con la región acídica y, 3) dos dominios centrales que participan directamente en la unión específica y selectiva del receptor (Gurevitch, et al, 1995)

La **desensibilización heterológa** o no específica de agonista. En este tipo de desensibilización la estimulación dada por un agonista atenúa la respuesta a distintos agonistas operando a través de diferentes tipos de receptores. Los receptores acoplados a proteínas G son fosforilados por cinasas dependientes de segundos mensajeros, como PKC y PKA. Estas cinasas no sólo afectan a receptores estimulados por su agonista sino también otros receptores diferentes. Esto es debido a que la activación de las cinasas por alguna de las vías de transducción es suficiente para causar la fosforilación del receptor y que la activación (ocupación del agonista) no afecta marcadamente la cinética de fosforilación. Ambos procesos puede ocurrir simultáneamente en una célula. (Chuang, et al, 1996)

En experimentos con receptores adrenérgicos, sobre todo en el receptor adrenérgico α_{1B} , la activación del receptor por norepinefrina promueve su desensibilización, la fosforilación e internalización con la participación de PKC. Los blancos potenciales de esta cinasa son el receptor y la PLC, y su activación atenúa la actividad del recambio de fosfoinosítidos (Leeb-Lundberg, 1987; Lattion, 1994; Hirasawa, et al, 1998). Por análisis de fosfoaminoácidos del receptor se han localizado los residuos implicados en la inducción de estos procesos por catecolaminas y esteroides de forbol (activadores de PKC), en el carboxilo terminal, como son: la Ser³⁹⁴ y Ser⁴⁰⁰ para la fosforilación de PKC y Ser⁴⁰⁴, Ser⁴⁰⁸ y Ser⁴¹⁰ para las GRKs (cinasas de receptores acoplados a proteínas G). También se han localizado los sitios de fosforilación para PKA en el tercer asa intracelular del receptor (Diviani, et al, 1997).

II.- ANTECEDENTES

En un principio los receptores adrenérgicos sólo estaban clasificados en α_{1A} y α_{1B} (Morrow y Creese, 1986; Terman, 1990). Esta clasificación se basa en la afinidad del receptor por ciertos compuestos (agonistas y antagonistas) y a su sensibilidad a cloroetilclonidina (CEC) (LeClerc, et al,1980; Han, et al,1987). Más tarde con el advenimiento de nuevas técnicas y estrategias moleculares tales como la obtención de agentes químicos más selectivos para cada subtipo y de mejores métodos bioquímicos de detección, surgió a la luz un nuevo receptor adrenérgico similar a los ya existentes pero con características particulares denominado α_{1D} (Perez, et al, 1991). Aunque en algún momento hubo discusión con respecto a que el receptor adrenérgico α_{1D} fuera un nuevo subtipo distinto al α_{1A} (Lomasney, et al, 1991), muchos trabajos han constatado la existencia de este tercer receptor. Esto llevó a cambiar la clasificación y la nomenclatura de los receptores adrenérgicos de acuerdo a nuevos criterios (Bylund, et al, 1994; Ford, et al,1994; Michel, et al, 1995).

Casi inmediatamente después de haberse obtenido la secuencia del DNA del receptor adrenérgico (RA) α_{1D} de rata (Lomasney, et al, 1991; Perez, 1991) se obtuvo la secuencia del receptor α_{1D} humano (Bruno, et al, 1991; Forray, 1994; Schwinn, 1995; Esbenshade, 1995). En el caso de este último receptor ha resultado más difícil determinar su participación en la fisiología celular, debido a que surgieron problemas desde la secuencia original reportada en la que se detectaron errores (Schwinn, et al, 1995) hasta en su expresión y en la manifestación de su respuesta funcional en diferentes sistemas.

Los receptores adrenérgicos α_{1D} se han expresado en diferentes líneas celulares COS-1, COS-7, PC12, HEK293 de manera transitoria; y en forma estable

en células como CHO, Rat-1 y SK-N-MC. También se ha observado la distribución y la participación de estos receptores en diferentes tejidos.

Gracias a estos estudios se sabe que el receptor α_{1D} es un receptor de siete dominios transmembranales con un peso molecular de entre 70-80kDa. Este receptor se acopla al sistema fosfoinosítidos/ Ca^{2+} vía proteínas Gq, pero menos eficientemente que los otros subtipos. Se le ha asignado también un papel importante en el sistema circulatorio, en especial en arterias y en la contracción muscular (Villalobos-Molina e Ibarra, 1996; Ibarra, et al, 1997; Gisbert, et al, 2000), que son actividades iniciadas por la estimulación de catecolaminas. Además es interesante, que a pesar de ser un receptor de superficie celular se le encuentra en cantidad considerable en el interior de la célula (Chalothorn et al, 2002). Existen trabajos sólo en el receptor adrenérgico α_{1D} de rata en los que se demuestra que el receptor desensibiliza y presenta fosforilación (García-Sáinz, et al, 2001). El mecanismo de regulación exacto del receptor α_{1D} se desconoce y faltan muchas preguntas por contestar. De los tres subtipos de receptores adrenérgicos α_1 , el α_{1D} es el que menos se conoce, de ahí el interés por estudiarlo. Además el análisis de este receptor se ha demorado por la falta de anticuerpos y fármacos más específicos que reconozcan al receptor.

En este trabajo se tiene como finalidad obtener una línea celular que exprese el receptor α_{1D} humano permanentemente. Determinar la funcionalidad del receptor, sus características farmacológicas, y su mecanismo de señalización y regulación. Estos estudios contribuirán a determinar el papel funcional del receptor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Generar una línea celular que exprese establemente al receptor adrenérgico α_{1D} humano y caracterizar funcional y farmacológicamente a este receptor.

Objetivos particulares

- 1.-Generar una línea que exprese permanentemente al receptor α_{1D} adrenérgico humano en fibroblastos Rat-1 silvestres.
- 2.-Establecer la funcionalidad del receptor expresado, determinando la producción de segundos mensajeros (IP_3 y $[Ca^{2+}]_i$).
- 3.-Cuantificar los receptores expresados en la membrana por ensayos de unión a ligando.
- 4.-Determinar la constante de afinidad de los receptores a través de estudios de unión a ligando.
- 5.-Establecer las características farmacológicas del receptor expresado, por ensayos de competencia por el sitio de unión utilizando un radioligando contra agonista y antagonistas de los receptores adrenérgicos.
- 6.-Determinar si el receptor se desensibiliza.

IV. HIPÓTESIS

El receptor adrenérgico α_{1D} humano tiene características típicas de este subtipo de receptores adrenérgicos.

V. MATERIALES

Reactivos:

(-)-Norepinefrina (NE), (-)-Epinefrina, BMY7378, Ácido Lisofosfatídico (LPA), Tetradecanoil Forbol Acetato (TPA), Metoxamina, Oximetazolina, Fentolamina, Bacitracina, Inhibidor de tripsina, Leupeptina, Hepes, Pirofosfato de sodio, Cloruro de magnesio, Etilen-di-amino ácido-tetra-acético (EDTA), (EGTA), β -Glicerofosfato, Formato de amonio y de sodio, Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y Tritón X-100 fueron de Sigma; 5-metil-urapidil se compraron de Research Biochemicals International. Fura 2AM acetometil ester fue de Molecular Probes. El ácido fórmico fue de Fulka; [^3H] tamsulosina (56.3 Ci/mmol), [^{125}I] aril azido prazosina (2200Ci/mmol) y [$2,3\text{-}^3\text{H}$] mioInositol (22.9Ci/mmol) se compraron de New England Nuclear. Los fosfatos de sodio y cloruro de sodio fueron de Baker; columnas de Dowex AGI-X8 compradas a Bio Rad .

Cultivo:

Medio de cultivo DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), suero bovino fetal, tripsina, antibióticos: estreptomina, penicilina, amfotericina B y G418 obtenidos de Gibco Life Technologies; Lipofectamina 2000 adquirida de Invitrogen; fibroblastos silvestres Rat-1, fueron donados por Dr. Fernando López Casillas. Medio de cultivo LB (NaCl, peptona de caseína y extracto de levadura), ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, cloruro de calcio y RNAasa fueron de Sigma, el kit (buffers y columnas) para purificar el plásmido fue de Qiagen; la cepa bacteriana competente MC1061/P3; el plásmido del receptor α_{1D} humano clonado dentro del vector de expresión pcDNA1neo (Weinberg, et al, 1994), fue donado por el Dr. Marvin Bayne.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI.-METODOLOGÍA

Transformación de bacterias y purificación del plásmido

1) Transformación:

-Las células competentes MC1061/P3 y el plásmido pcDNA1neo que contenía al inserto del receptor adrenérgico α_{1D} humano fueron incubados en hielo por 10 minutos, y a continuación se les dio un choque térmico de 42°C por 45s.

-Se adicionó 1mL de medio LB y la mezcla del plásmido con las células competentes se incubaron a 37°C por 1h.

-La mezcla se centrifugó a 5000rpm y el botón fue resuspendido en 200 μ L de LB.

- Las células transformantes se plaquearon en una caja bacteriológica con medio LB con ampicilina, kanamicina y tetraciclina, la caja se mantuvo a 37°C hasta crecieron colonias.

2) Cultivo bacteriano:

-De las células transformadas se escogió una colonia y se colocó en 2mL de medio líquido de LB con ampicilina, kanamicina y tetraciclina, se incubaron a 37°C, manteniéndose en agitación a 250rpm toda la noche.

-El tubo con el cultivo transformante se vació en 100mL del mismo medio y se volvió a incubar hasta que el cultivo llegó a una absorbancia de 1-1.5 a 600nm.

-Se agregó 90 mg. de cloranfenicol y se dejó incubando toda la noche a 37°C y a 250rpm .

3) Purificación del plásmido:

-El cultivo bacterial se centrifugo a 6000 rpm a 4°C por 15min.

-Se tiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 4mL del buffer P1 o de resuspensión (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10mM EDTA; 100 µg/mL RNAasa A) y se agregó 4mg más de RNAasa.

-Se adicionaron 4mL de buffer P2 o de lisis (200mM NaOH, 1% SDS), se mezcló y dejó reposando 5 minutos a temperatura ambiente.

-Se agregó el buffer P3 o de neutralización (3.0M de acetato de potasio, pH 5.5) se agitó e incubó en hielo por 15min.

-Las bacterias se centrifugaron a 11000rpm a 4°C durante 30min; mientras se equilibró y lavó una columna con 4mL de QBT (750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7.0; 15% etanol; 0.15% Tritón X-100).

-Se filtró el sobrenadante en un filtro Whatman y después se pasó por una columna.

-Se lavó la columna con 10mL del buffer QC o de lavado (1.0M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8.5; 15% etanol).

-El DNA se eluyó con 5mL de QF (1.25M NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 8.5; 15% etanol).

-El DNA se precipitó con 3.5mL de isopropanol, se mezcló y centrifugo.

-Se lavó el DNA precipitado dos veces con 2mL de etanol al 70%.

-La pastilla formada de DNA del receptor se dejó secar al aire libre y después se resuspendió en 200µL de agua.

-Se hizo una dilución y se cuantificó la cantidad de plásmido en un espectrofotómetro Beckman en la longitud de onda de UV a 260 y 280 nm.

Transfección, selección y cultivo celular

-Las células Rat-1 silvestres se cultivaron en cajas de 6 pozos y se mantuvieron a 37 °C y 95% aire 5% CO₂ en medio DMEM con 10 % suero fetal bovino y antibióticos.

-Transfección: 1) al siguiente día las células Rat-1 silvestres fueron lavadas con DMEM sin suero. 2) Se hizo una mezcla del plásmido purificado (20µL) conteniendo al receptor α_{1D} humano con Lipofectamina 2000 (15µL) en un volumen de 600µL de DMEM sin suero y se dejó reposar esta mezcla por 30 min. 3) La mezcla del plásmido fue adicionada a las células y fueron incubadas 5 hrs. a 37°C. 4) Se retiró la mezcla de transfección, se lavaron las células y se les colocó el medio DMEM completo con 300 µg/mL del antibiótico G418. 5) a los tres días se cambió la concentración del G418 a 600 µg/mL.

- Selección: 1) Se llevó a cabo por dilución limitante y en presencia del antibiótico G418 (600 µg/mL). 2) Cuando crecieron las colonias de las células Rat-1 fueron expandidas 3) se probó su funcionalidad de cada colonia a través de la medición de segundo mensajeros y se eligió solo una colonia de células Rat-1 que expresara al receptor adrenérgico α_{1D} humano.

Medición de la liberación de calcio intracelular

- 1) Las células con el receptor silvestre o α_{1D} humano se cultivaron en cajas Petri hasta obtener una población del 90%.
- 2) Se dejaron en ayuno de suero por 18 hrs.
- 3) Al siguiente día, se lavaron con PBS y se incubaron con 3mL Krebs-Hepes-BSA (Hepes 20mM, NaCl 120mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.75mM, BSA 0.05%, glucosa 10mM) y de Fura 2-AM (5µM) por 1h a 37°C.
- 4) Las células se despegaron con tripsina, se lavaron y resuspendieron en Krebs-Hepes-BSA con CaCl₂ 1.3 mM, tres veces.
- 5) La medición de la liberación de calcio se realizó en un espectrofluorómetro (AMINCO-Bowman Serie 2) en donde las células se mantuvieron en suspensión y agitación a 37°C; y fueron estimuladas con el tratamiento correspondiente. Los trazos fueron registrados a las siguientes longitudes

de onda: 340 y 380 de excitación y 510 nm de emisión con intervalos de 0.5 s. La cuantificación de calcio se obtuvo de la relación de fluorescencia máxima y mínima de acuerdo a la ecuación:

$$[Ca^{2+}]_i = Kd[(R-R_{min})/(R_{max}-R)] [Sf/Sb_2]$$

Kd=constante de afinidad del Fura2AM (224nM); R=lectura de fluorescencia en unidades arbitrarias; Rmin=Fluorescencia mínima, al agregar el EGTA 5mM (quelato de calcio) y Rmax=Fluorescencia máxima al lisar las células con TritónX-100 al 1%; Sf y Sb= coeficientes de proporcionalidad del Fura libre Sf y unido Sb al Ca en la longitud de onda 2. (Grynkiewicz et al, 1985). Los datos se calcularon con el programa Prim3.0/GraphPad.

Cuantificación de la producción de fosfatos de inositol

- 1) Las células expresando establemente al receptor α_{1D} humano fueron sembradas en cajas de seis pozos, al estar al 90% de crecimiento se dejaron incubando con $3 \mu\text{Ci/mL}$ de $[^3\text{H}]$ mioinositol en el medio DMEM (sin inositoles y con 1% de suero), de 12 a 18 hrs.
- 2) El día del experimento las células fueron lavadas dos veces con PBS y preincubadas por 20 min con 1 mL/pozo de solución Krebs-Ringer-Hepes (Hepes 20mM, NaCl 120mM, KH_2PO_4 1.2mM, MgSO_4 1.2mM, KCl, 1.3 mM CaCl_2) pH 7.4 más 20mM de LiCl a 37°C y 5% de CO_2 .
- 3) A continuación se estimuló con $10 \mu\text{L}$ NE y/o BMY7378 y/o TPA por 15 min., se paró la reacción con ácido perclórico frío al 30%, se rasparon las células y se pasaron a tubos donde se neutralizó con una solución KOH 1.5M, Hepes 75mM ajustando el pH entre 7.3-7.8, luego se centrifugaron a 3000rpm por 10min y se tomó el sobrenadante el cual se pasó por columnas de Dowex AG1-X8.
- 4) Los fosfatos de inositol totales fueron separados por cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Dowex AG1-X8, aplicando amortiguadores de diferentes concentraciones de sales, para: GP1, 5mM borato de sodio y 180mM de formato de sodio y para inositoles fosfato totales, 0.1M ácido fórmico y 1M formato de amonio (modificado de Berridge et al., 1983).
- 5) Las muestras se registraron como DPM (desintegraciones por minuto) en el contador de centelleo Beckmann LS600SE.

Preparación de las membranas

1) Aproximadamente 30 cajas Petri con células α_{1D} humano que expresan establemente al receptor fueron lavadas con PBS frío e incubadas 20 min. en hielo en una solución de lisis pH7.5 (Hepes 20mM, pH 7.5; EDTA 5mM, pirofosfato de sodio 10mM, Na_3VO_4 1mM, β -glicerofosfato 10mM, MgCl_2 2mM, inhibidores de proteasas (leupeptina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bacitracina 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inhibidor de tripsina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2) Fueron raspadas, homogenizadas y centrifugadas 20 min a 13000 rpm a 4°C.

3) El botón se resuspendió en 250 μL de Tris 50mM y MgCl_2 10mM.

4) La concentración de proteína (mg/mL) fue determinada por el método modificado de Lowry, 1951. Se utilizó albúmina bovina como estándar.

Ensayo de unión a ligando

1) Las membranas fueron incubadas 1h a 37°C en agitación; para los experimentos de saturación, con o sin el antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_{1D} (BMY7378), a una concentración fija de 10 μM más [^3H] tamsulosina (a diferentes concentraciones); para el estudio de la competencia por el sitio de unión, las membranas fueron tratadas con diferentes concentraciones de agonistas (norepinefrina, epinefrina, metoxamina, oximetazolina) y antagonistas (BMY7378, fentolamina, 5-metil-urapidil), a una concentración fija de [^3H] tamsulosina (2nM) en la que aproximadamente el 80% de los receptores estuvieran ocupados.

2) A continuación se paró la reacción con el buffer (Tris 50mM y MgCl_2 10mM) y las muestras fueron filtradas en el aparato denominado Brandell y lavadas tres veces con el mismo buffer.

3) Los filtros con las muestras se leyeron en un contador de centelleo líquido. El cálculo y el análisis para determinar la K_d , B_{max} y K_i fueron realizados con los programas EBDA y Prim3.0/GraphPad.

Fotomarcaje

- 1) Las membranas (100 μg) fueron incubadas 1h a 37°C en la obscuridad con 6nM de [^{125}I] azido prazosina y con/sin 10 μM BMY7378.
- 2) Se detuvo la reacción con 1mL de Tris/HCl 50mM más NaCl 150mM, 5mM EDTA pH 7.5 adicionado con inhibidores de proteasas.
- 3) A continuación fueron expuestas a radiación UV con una $E=6000 \mu\text{J}$ por 3 min.
- 4) Se centrifugaron a 13,000rpm por 15 min.
- 5) El botón fue resuspendido en SDS 10% más Laemli 3x, a continuación las muestras fueron puestas en agua hirviendo y centrifugadas.
- 6) Las muestras fueron corridas en un gel de electroforesis de acrilamida al 7.5% en condiciones desnaturalizantes.
- 7) El gel se secó y se expuso en una placa de autoradiografía del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics .
- 8) La visualización y de detección se realizo empleando el software Image Quant del aparato denominado Thyphoon del sistema Phosphor Imager de Molecular Dynamics .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII.RESULTADOS

Expresión estable del receptor adrenérgico α_{1D} humano

El receptor adrenérgico α_{1D} se encuentra clonado dentro del vector de expresión pcDNA1neo (Fig.1). Lo primero que se hizo fue producir y purificar más cantidad del plásmido con el inserto del receptor. Después, los fibroblastos Rat-1 se transfectaron y las colonias sobrevivientes se seleccionaron por dilución limitante con el antibiótico G418. Las células Rat-1 se utilizaron porque que no expresan endógenamente ningún tipo de receptor adrenérgico y también porque su maquinaria celular permite la expresión de este receptor establemente. Esta metodología (transfección) permite estudiar el funcionamiento molecular del receptor de manera aislada. Cada clona transfectante fue probada midiendo su funcionalidad como se describe en el siguiente apartado.

Funcionalidad del receptor expresado

Los receptores adrenérgicos α_1 se acoplan a la vía de señalización del sistema de recambio de fosfoinosítidos/calcio, por tal razón se decidió probar la funcionalidad del receptor expresado establemente a través de la producción estimulada por norepinefrina (NE) de segundos mensajeros (liberación de $[Ca^{2+}]_i$ y producción de IP_3). En la Fig.2 se observa que la NE indujo un incremento inmediato en la liberación de calcio intracelular en la clona que expresa el receptor adrenérgico α_{1D} humano a diferencia de los fibroblastos silvestres (sin el receptor). El incremento sobre el basal fue pequeño pero constante.

Con el fin de conocer el efecto máximo y mínimo de la norepinefrina en la liberación de calcio intracelular, se prosiguió a probar diferentes concentraciones de esta hormona. Se observó una respuesta dependiente de la dosis, es decir el efecto aumenta al incrementar la concentración (Fig.3A). La respuesta mínima se observó desde $0.1 \mu\text{M}$ y la respuesta máxima con las concentraciones de 100 y $10 \mu\text{M}$, además en los trazos representativos de cada dosis (Fig.3B) se observa que la respuesta es gradual.

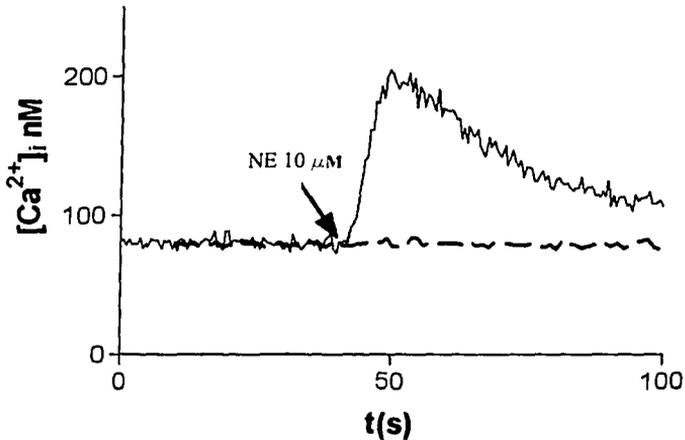
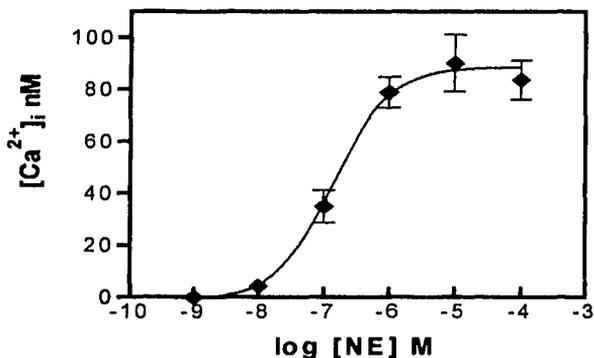


Figura.2 Efecto de la NE en la concentración de calcio intracelular

Las células transfectadas con el receptor α_{1D} humano (línea delgada) y las células silvestres (línea gruesa), ambas cargadas con Fura-2AM, fueron estimuladas con $10 \mu\text{M}$ de norepinefrina (NE). La concentración intracelular de calcio ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se calculó a partir de los cambios de fluorescencia de Fura 2-AM. Los datos mostrados son de un experimento representativo de al menos cinco realizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



B

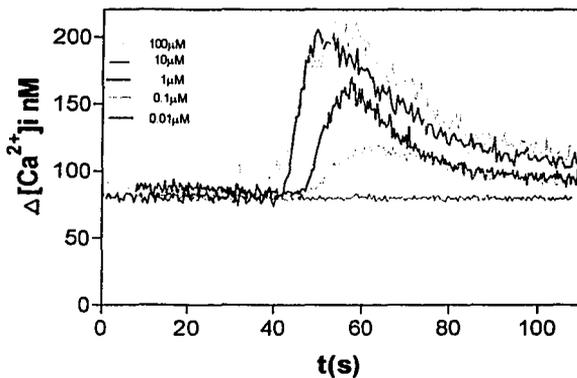


Figura.3 Efecto de la NE a diferentes concentraciones en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$. Las células transfectadas con el receptor α_{1D} humano fueron cargadas con Fura-AM y estimuladas a diferentes concentraciones de norepinefrina (NE). **A.** - Curva dosis respuesta, muestra las concentraciones utilizadas y sus incrementos correspondientes (rombos negros) que representan al porciento del incremento promedio observado en las células estimuladas. **B.**- Trazos representativos de cada concentración, (amarillo, $0.01\mu M$; rosa, $0.1\mu M$; azul, $1\mu M$; rojo, $10\mu M$ y verde, $100\mu M$). Se realizaron de cinco a diez experimentos por concentración de NE, calculándose en cada caso el promedio y la desviación estándar. La concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) se determino a partir de los cambios de fluorescencia de Fura 2-AM.

Después de haber constatado que las células con el receptor expresado respondían al ser estimuladas con norepinefrina, nos interesó conocer el efecto inhibitorio del BMY7378, un antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_{1D} (Goetz, A.S., 1995), para confirmar que el receptor expresado correspondía al subtipo α_{1D} . Este agente químico tuvo un efecto inhibitorio en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ de manera dependiente de la dosis, a 10nM la liberación de calcio dada por norepinefrina se redujo de manera significativa pero con 100nM se abolió completamente.

En todos los experimentos se probó la respuesta en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ al estimular con ácido lisofosfatídico (LPA) como control del estado de las células, ya que éstas tienen receptores a LPA.

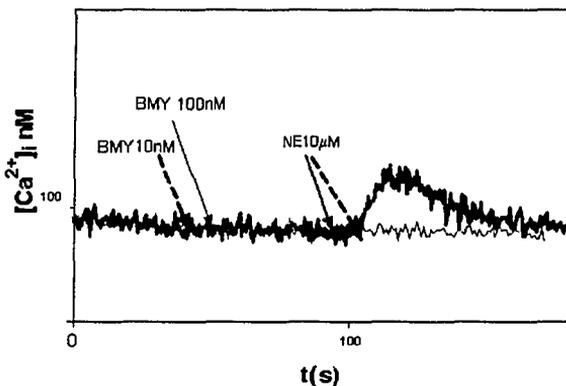


Fig.4 Efecto del BMY7378 sobre la respuesta de NE en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$

Las células con el receptor α_{1D} humano (cargadas con fura-2AM) fueron estimuladas primero con BMY7378 10nM, trazo azul o 100nM, trazo rojo y a continuación con 10 μ M de norepinefrina (NE). Se realizaron dos experimentos por cada concentración. La concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) se calculó a partir de los cambios de fluorescencia de Fura 2-AM.

A continuación se cuantificó la producción de fosfatos de inositol. Se observó un nivel basal alto independiente del ligando. Al estimularse las células que expresaron el receptor adrenérgico α_{1D} humano con norepinefrina se observó un ligero aumento de un 60% sobre el basal. Al tratar las células con BMY7378 la producción de fosfatos de inositol fue inhibida hasta el nivel basal. Así mismo al tratar con ambos agentes los fosfatos de inositol disminuyeron casi en su totalidad (Fig.5).

Estos resultados de funcionalidad demuestran que el receptor está acoplado al sistema de recambio de fosfoinosítidos/calcio a través de la activación de una fosfolipasa C (PLC), lo que conlleva a la producción de estos segundos mensajeros.

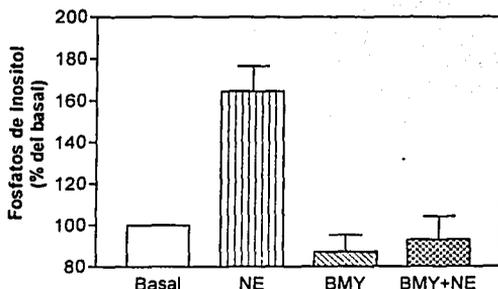


Fig.5 Producción de Fosfatos de inositol totales.

Las células que expresaron el receptor adrenérgico α_{1D} humano, fueron incubadas previamente con [3 H] mioinositol por 18hrs., se estimularon con NE 10 μ M y/o BMY7378 10 μ M. El basal representa a las células sin tratamiento y su respuesta fue considerada como el 100%.

Detección del Receptor Adrenérgico α_{1D}

Con el propósito de observar al receptor y comprobar de otra forma que el receptor expresado pertenecía al α_{1D} se procedió a realizar el marcaje de fotoafinidad. Las membranas de la línea celular Rat-1 que expresan al receptor adrenérgico α_{1D} humano y al receptor de rata fueron incubadas (en preparaciones separadas) con el radioligando [125 I]-aril azido prazosina, antagonista irreversible unido a un compuesto sensible a la luz. Y en presencia o ausencia del agente selectivo del subtipo α_{1D} (BMY7378), para asegurar que la unión fuera específica. Una banda de ~ 70 kDa fue observada correspondiente al peso del receptor. El receptor α_{1D} humano apenas es visible, lo que podría indicar un número menor de receptores en la membrana (Fig.6).

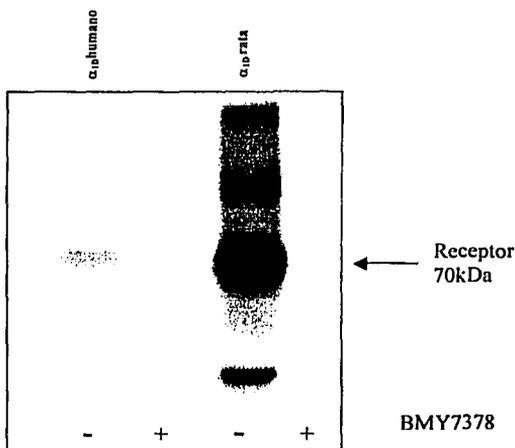


Figura.6 Fotomarcado de los receptores adrenérgicos α_{1D}

Estos experimentos se realizaron con membranas de las células Rat-1 que expresan el receptor α_{1D} de humano y el de rata. Se hicieron en presencia de [125 I] azido prazosina (6nM) y con (+) o sin (-) de BMY7378 10 μ M. En ambos casos se observa (flecha) una banda de ~ 70 kDa que corresponde al peso molecular del receptor.

Propiedades farmacológicas

La caracterización farmacológica se realizó por experimentos de unión a ligando de tipo saturante y de competencia. La unión del radioligando [3 H] tamsulosina a los receptores fue saturable, es decir todos los sitios de unión fueron encontrados ocupados, en membranas de células Rat-1 expresando el receptor adrenérgico α_{1D} (Fig.7). La curva hiperbólica muestra la relación de tamsulosina unida contra la tamsulosina total. En el recuadro se observa la gráfica de Scatchard, que sugiere una población homogénea de receptores. Al analizar los datos en el programa EBDA, se calculó una Bmax de 40fmol/mg de proteína, que define el número de receptores (el valor de intersección del eje x o pegado máximo), y la afinidad calculada fue de 0.3nM .

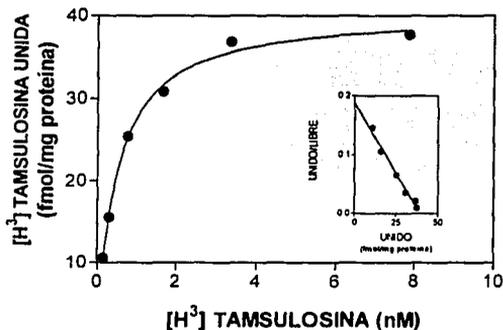


Figura7. Curva de saturación con tamsulosina

La curva hiperbólica muestra la de saturación del sitio de unión de los receptores y el recuadro muestra la linealización de la curva (gráfica de Scatchard). Las membranas aisladas del α_{1D} humano fueron incubadas con o sin BMY7378 (10 μ M) y con varias concentraciones de [3 H] tamsulosina. De estos experimentos se determinó el número de receptores (40fmol/mg de proteína) y la afinidad del pegado ($K_d=0.3$ nM), para calcularlos fue utilizado el programa EBDA. Los datos son representativos de tres experimentos. Los valores de los parámetros se obtuvieron del promedio \pm D.E.

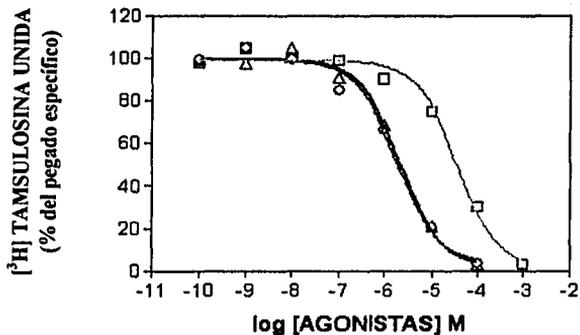


Figura.9 Curvas de los desplazamientos con agonistas

Las curvas muestran la competencia con tamsulosina y los agonistas: norepinefrina (círculos verde), epinefrina (triángulos rosas) y oximetazolina (cuadrados morados). Las curvas son representativas de tres experimentos usando diferentes preparaciones de las membranas de las células Rat-1 con el receptor adrenérgico α_{11} de humano.

Agonista	Ki (nM)	Pendiente
Norepinefrina	478±27	0.81±0.007
Epinefrina	439±98	0.85±0.07
Oximetazolina	4827±340	0.74±0.06

Tabla1. Parámetros farmacológicos de los agonistas

Los valores se obtuvieron de los experimentos de competencia, cada uno representa el promedio ± D.E. de al menos tres experimentos cada uno hecho por duplicado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

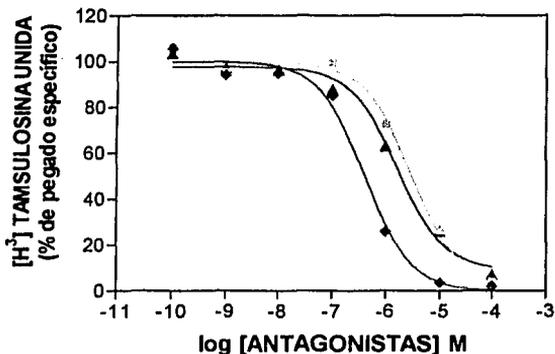


Figura.9 Curvas de los desplazamientos con antagonistas

Las curvas de desplazamiento muestran el comportamiento de los antagonistas: BMY7378 (rombos azules), fentolamina (cuadrados amarillos) y 5-metil-urapidil (triángulos rosas) al competir con tamsulosina. Las curvas son representativas de tres experimentos usando diferentes preparaciones de las membranas de las células Rat-1 con el receptor adrenérgico α_{1D} de humano

Antagonista	K_i (nM)	Pendiente
BMY7378	8.4 ± 2	1
Fentolamina	58 ± 5	0.6 ± 0.17
5-Metil-Urapidil	55 ± 5	0.72 ± 0.06

Tabla.2 Parámetros farmacológicos de los antagonistas.

Los datos se obtuvieron de los experimentos de competencia, cada valor representa el promedio \pm D.E. de tres experimentos cada uno hecho por duplicado.

Continuando el estudio de la interacción receptor-ligando, se determino el comportamiento farmacológico de algunos agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos por medio de experimentos de competencia por el sitio de unión. En dichos experimentos se mantuvo fija una concentración saturante del radioligando [^3H] tamsulosina y se variaron las concentraciones de los fármacos. Las curvas fueron de tipo dosis-dependiente con forma sigmoidal. El desplazamiento (representa la potencia del efecto) de los agonistas (Fig.8) fue el siguiente: epinefrina \geq norepinefrina $>$ oximetazolina y para los antagonistas (Fig.9): BMY7378 $>$ 5-Metil-Urapidil \geq Fentolamina. La K_i se refiere a la concentración necesaria para bloquear o activar el 50% de la respuesta máxima. Los parámetros fueron calculados a partir del promedio \pm D.E.

Regulación del receptor adrenérgico α_{1D} humano

La activación de PKC por ésteres de forbol bloquea la acción de los receptores adrenérgicos, por lo que se probó el efecto del TPA (tetradecanoil forbol acetato) un estér activador de esta cinasa. La participación de TPA fue determinada sobre la respuesta de norepinefrina (NE) en la liberación de calcio intracelular y en la producción de fosfatos de inositol. El TPA inhibió totalmente la respuesta de NE en la liberación de calcio (Fig.10). Así mismo el TPA causó un ligero aumento sobre el basal en la producción de fosfatos de inositol pero bloqueó totalmente el estímulo por NE (Fig.11). De esta manera se pudo establecer que el receptor se desensibiliza en parte a través de PKC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

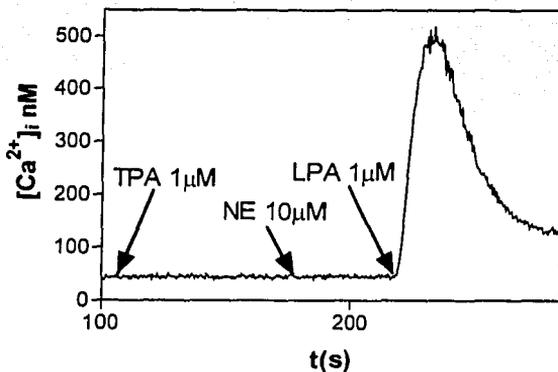


Figura.10 Efecto del TPA sobre la respuesta de NE en la $[Ca^{2+}]_i$. Las células con el receptor α_{1D} de humano, cargadas con fura-2AM, fueron tratadas primero con el TPA, 1M e incubadas por 30 min., a continuación se estimularon con norepinefrina (NE), 10M y con 1 M de ácido lisofosfatidico (LPA).

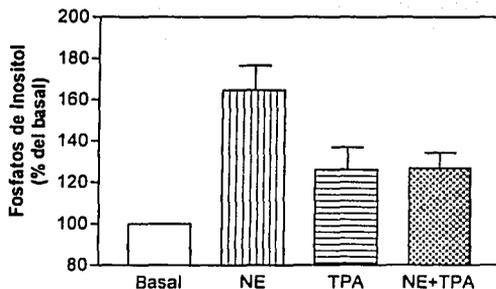


Figura.11 Efecto del TPA en la producción de fosfatos de inositol. Las células que expresaron el receptor adrenérgico α_{1D} humano, fueron incubadas previamente con $[^3H]$ mioinositol por 18hrs., se estimularon con TPA 10 μM y/o NE 10 μM . El basal representa a las células sin tratamiento y su respuesta fue considerada como el 100%. Presentaron los siguientes valores del promedio de cinco experimentos: NE, 164±12; TPA, 126±11 y NE+TPA, 127±7.5

VIII. DISCUSIÓN

El estudio del receptor adrenérgico α_{1D} humano ha sido el principal objetivo de este trabajo. Por lo que fue importante expresar este receptor en un sistema que nos permitiera conocer sus características funcionales y farmacológicas. De esta manera se escogió introducir el DNA del receptor en los fibroblastos Rat-1, ya que se conoce que estas células no presentan ningún tipo de receptor adrenérgico endógeno. Además las células Rat-1 tienen una maquinaria funcional que permite que estos receptores sean expresados de manera permanente. El cDNA del receptor fue aislado de una biblioteca de hipocampo humano (Bruno, 1991) y clonado dentro del vector pcDNA1neo (Weinberg, 1994). Al comparar las secuencias se encontró una alta homología entre el receptor humano y el de rata (86%), y también con el de conejo, (89%) (Suzuki, 1997).

Se han aislado dos cDNA del receptor adrenérgico α_{1D} , además del mencionado arriba: 1) una clona del receptor se aisló de la librería genómica y de cDNA del hipocampo humano y fue subclonada en el vector pcEXV-3, y 2) la otra clona se obtuvo de una librería de próstata humana y a su vez fue comparada contra una biblioteca de leucocito humano. Esta fue subclonada en los vectores de expresión pZipNeo y pcDNA3 (Schwinn, 1995). Entre las tres secuencias de los cDNA de los receptores adrenérgicos α_{1D} humanos se han encontrado algunas diferencias las cuales se han corregido.

En este trabajo, el receptor adrenérgico α_{1D} humano se logró expresar de manera estable en células Rat-1 y, esto fue corroborado por los ensayos de funcionalidad y de unión a ligando. La liberación de calcio intracelular se vio al estimular con norepinefrina (Fig.2) en comparación con las células silvestres, estos resultados mostraron evidentemente que el receptor fue procesado por la maquinaria de estas células y finalmente expresado. El incremento en la liberación

de $[Ca^{2+}]_i$ fue del doble sobre el basal a diferencia del receptor adrenérgico de rata en el que se reporta el triple (Vázquez-Prado y García-Sáinz, 1996; García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999), aún así la respuesta dependió de la dosis (Fig. 3 y 4). También se observó la producción de fosfatos de inositol al estimular con norepinefrina (Fig. 5), donde la respuesta fue pequeña de sólo un 50-60% sobre el basal. Las células transfectadas presentaron un nivel basal elevado en ausencia del estímulo. Estos datos muestran que el receptor expresado puede presentar actividad α_{1D} adrenérgica independiente del ligando en estas células, lo cual sería una de las razones por las que la formación sobre el basal de segundos mensajeros sea tan baja.

La expresión baja y el acoplamiento pobre de estos receptores se ha observado también en otros trabajos en comparación a los subtipos α_{1A} y α_{1B} , (Esbanshade, 1995; Theroux, 1996; Taguchi, 1998; Zhong, 1999). Al parecer el número de receptores no está involucrado. Debido a que en experimentos en los que se igualaron la cantidad de receptores de los tres subtipos, el α_{1D} siguió siendo el que menos se acopla al sistema de transducción. Con el fin de buscar una respuesta a esto, un grupo de investigación decidió estudiar el amino terminal del receptor adrenérgico α_{1D} , ya que como se mencionó antes, es el más largo entre los tres subtipos, así que truncaron el receptor eliminando los primeros 79 aminoácidos y esto causó un incremento de 6 a 13 veces en la densidad de sitios de unión, sin aumentar la expresión de la proteína (Pupo y Minemann, 2003). Es probable que exista algún mecanismo aún desconocido en los que estén involucrados estructura y/o procesamiento del receptor.

Además los datos de producción de IP_3 en los receptores expresados se relacionan con los de calcio, ya que la producción de fosfatos de inositol permite la liberación de calcio de reservorios intracelulares, en especial del retículo endoplásmico donde se encuentran receptores para IP_3 dejando el paso a la salida del calcio almacenado. Los resultados demuestran el modelo de activación de

receptores adrenérgicos α_1 con la probable participación de Gq que activa a PLC- β , y a su vez ésta estimula la formación de segundos mensajeros por la vía de transducción de fosfoinosítidos/calcio.

El BMY7378, antagonista selectivo de los receptores adrenérgicos α_{1D} , inhibió el efecto de la norepinefrina tanto en la liberación de calcio como en la producción de IP_3 , y la disminución fue dependiente de la concentración en la liberación de calcio observándose abatida totalmente con $10 \mu M$ del antagonista. El BMY7378, a pesar que inhibió la respuesta al nivel basal, no actuó en estas células como agonista inverso, como lo hace en el receptor adrenérgico α_{1D} de rata, que desde una concentración de $0.1 \mu M$ se observa el calcio disminuido a niveles por debajo del basal (García-Sáinz y Torres-Padilla, 1999). El efecto del BMY7378 sobre la producción de IP_3 fue similar, ya que también hay una disminución sobre la estimulación con norepinefrina.

Al realizarse el fotomarcaje se logró la detección del receptor adrenérgico α_{1D} , visualizándose una banda de aproximadamente 70kDa (Fig.7) correspondiente al peso del receptor y se localizó otra banda de aproximadamente 40kDa en el gel dentro del carril correspondiente al receptor adrenérgico de rata. Al competir contra BMY7378 estas bandas no fueron detectadas, lo que significa que este receptor es el α_{1D} . Estos datos están de acuerdo a los ya reportados (Schwinn,1995; García-Sáinz, 2000). La banda del receptor de humano se nota menos intensa que la de rata, lo que nos puede dar una idea de que existe un menor número del receptor adrenérgico α_{1D} humano en la membrana celular. En experimentos de localización de los receptores adrenérgicos humanos (McCune, 2000), se observó que el α_{1D} se encontraba en la periferia nuclear y en reservorios intracelulares tales como endosomas; también observaron que a diferencia del α_{1B} que al ser estimulado viaja de la membrana al interior de la célula, lo que correspondería al ciclo de degradación y reciclamiento, el α_{1D} fue localizado primero en reservorios intracelulares, y al aplicar el estímulo los receptores se

dirigieron a la membrana. Aún se desconoce el mecanismo de este fenómeno de internalización y externalización.

Por otro lado, se realizaron dos tipos de experimentos de unión a ligando, uno de saturación y el otro de competencia de agonistas y antagonistas por el sitio de unión. Por los experimentos de saturación se observó que el receptor es saturable (Fig.7), también se calculó una K_d de 0.3nM que está en el rango de las reportada para este ligando y una B_{max} de 40 fmol/mg de proteína, la cual difiere de la de rata en ser 100 veces menor. De la transformación de Rosenthal o Scatchard, se linealizó la curva hiperbólica, lo que mostró la existencia de una sola población de receptores. Esto significa una afinidad específica constante a pesar de que hay menos receptores en la membrana.

En los experimentos de competencia por el sitio de unión se obtuvieron las K_i y las curvas de desplazamiento para cada fármaco, estos datos dieron una idea sobre el comportamiento del receptor al ser estimulados por ellos y de la relación de efecto-concentración. Los agonistas norepinefrina y epinefrina tuvieron mayor afinidad por el receptor seguidos por metoxamina y oximetazolina, (Fig. 8 y Tabla.1). De los antagonistas el que más afinidad tuvo fue el BMY7378, seguido por 5-metil urapidil y fentolamina (Fig.9 y Tabla2). Aunque en estos resultados se observa que hay diferencias en magnitud de las K_i , el comportamiento farmacológico es consistente con lo reportado para este tipo de receptor. Estas diferencias se pueden deber a la técnica para preparar las membranas, al tipo celular, así como al radioligando utilizado. Cabe mencionar que se usó la tamsulosina ya que es un compuesto altamente estable que permite que sea usado como radioligando porque no pierde sus propiedades, además de que no afecta la respuesta biológica, es selectivo y presenta alta afinidad por estos receptores.

Al estimular a las células con TPA, un éster de forbol, el efecto de la NE fue inhibido de una manera total en la liberación de calcio, lo que es consistente con la activación de PKC, pero la producción de fosfatos de inositol no fue abatida

totalmente. Estos datos junto con los resultados de la estimulación de calcio son consistentes en que el receptor sufre desensibilización por ligando (homóloga) y probablemente también por PKC. La PKC está involucrada en la fosforilación del receptor en muchos casos, tanto en el receptor adrenérgico α_{1D} de rata (Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, 1996) como en el α_{1B} de humano (García-Sáinz, 1999), entre otros. En el de humano no se han realizado este tipo de estudios debido a la dificultad en producir anticuerpos específicos para el mismo. Existen experimentos preliminares con el receptor adrenérgico α_{1D} sobre el papel de diferentes isoformas de PKC (Taguchi, 1998) pero estos datos no son concluyentes.

Este es un trabajo inicial que muestra parte del funcionamiento y regulación del receptor adrenérgico α_{1D} humano. Es indispensable conocer los procesos moleculares que se encuentran involucrados en su respuesta al ser activados por catecolaminas y como median esta señal, debido a que estos receptores tienen un papel fundamental en la fisiología y patología en el sistema circulatorio; están funcionalmente expresados en arterias como aorta, iliaca, carótida, mesentérica, femoral y renal, sugiriéndose una participación en el tono vascular periférico y en la hipertensión arterial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO DEBE
SER REEMBOLSA

IX. CONCLUSIONES

- Las células Rat-1 son capaces de expresar establemente a los receptores adrenérgicos del subtipo α_{1D} .
- El receptor adrenérgico α_{1D} humano se acopla al sistema de recambio de fosfoinosítidos/calcio.
- La respuesta en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$ fue dependiente de la dosis.
- El nivel basal de segundos mensajeros es alto, probablemente debido a una actividad constitutiva independiente de ligando, en las Rat-1 expresando al receptor α_{1D} permanentemente.
- El número de receptores presentes en la membrana es pequeño en comparación con los niveles de otros subtipos.
- El receptor muestra alta afinidad por BMY7378, norepinefrina y epinefrina.
- El receptor se desensibiliza parcialmente por PKC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S. Et al (2003) "Desensitization, Internalization, and signaling functions of β -arrestins demonstrated by RNA interference" PNAS. 100(4):1740-1744pp.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1996). Molecular Biology of the Cell. Cap. 15
- Ariens, E.J. y Beld, A.J.(1977) "The receptor concept in evolution" Biochemical Pharm. 26:913-918pp.
- Attie A. D. y Raines, R.T. (1995) "Analysis of Receptor-Ligand Interactions" J. of Chemical Education. 72(2):119-124pp.
- Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. y Irvine, R.F. (1983) "Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides" Biochem. J. 212:473-482pp.
- Berridge, M.J. y Irvine, R.F. (1989) "Inositol phosphates and cell signalling" Nature. 341:197-205pp.
- Bruno, J.F., Whittaker, J., Song, J. y Berelowitz, M. (1991) "Molecular cloning and secuencing of a cDNA encoding a human α_{1A} adrenergic receptor" BBRC. 179:1485-1490pp.
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R. y Trendelenburg, U. (1994) "IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors" 46(2): 121-136pp.
- Casey, P.J. y Gilman, A.G. (1988) "G Protein Involvement in Receptor-Effector Coupling" The JBC. 263(6):2577-2580pp.
- Cattabeni, F. y Nicosia, S. (1984) Principles and Methods in Receptor Binding. Life Science. Vol.72
- Celver, J., Vishnivetskiy, S.A., Chavkin, Ch. y Gurevich, V.V. (2002) "Conservation of the Phosphate-sensitive Elements in the Arrestin Family of Proteins" JBC. 277(11):9043-9048pp.
- Chalothorn, D., McCune, D.F., Edelmann, S.E., García-Cazarín, M.L., Tsujimoto, G. y Piascik, M.T. (2002) "Differences in the Cellular Localization and Agonist-

Mediated Internalization Properties of the α_1 -Adrenoceptor Subtypes" Mol. Pharmacol. 61:1008-1016pp.

Cheng, Y. e Prusoff, W. H. (1973) "Relationship between the inhibition constant (K_i) and concentration of inhibitor wich causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction" Biochemical Pharm. 22:3099-3108pp.

Diviani, D., Lattion, A-L. y Cotecchia, S. (1997) "Characterization of the Phosphorilation Sites Involved in G Protein Receptor Kinase C-mediated Desensitization of the α_{1B} -Adrenergic Receptor" The JBC. 272(45):28712-28719pp.

Docherty, J.R. (1998) "Subtypes of functional α_1 - and α_2 -adrenoreceptors" Eur. J. of Pharmacol. 361:1-15pp.

Downward, J. (2001) "The ins and outs of signalling" Nature. 411:759-762pp.

Dumont, J.E., Pécasse, F. y Maenhaut, C. (2001) "Crosstalk and specificity in signalling Are we crosstalking ourselves into general confusion?" Cell. Signalling. 13:457-463pp.

Esbenshade, T.A., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Tanaka, T., Yano, J., Minneman, K.P y Murphy, T.J. (1995) "Cloning of the Human α_{1d} -Adrenergic Receptor and Inducible Expression of Three Human Subtypes in SK-N-MC Cells" Mol. Pharmacol. 47:977-985pp.

Eun-Min, Hur y Kyong-Tai, Kim (2002) "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk Achieving rapidity and especifity" Cell. Sig. 14:397-405pp.

Ferguson, S. S. (2001) "Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling" Pharmacol. Rev. 53:1-24pp.

Ford, C. E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E. Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, Ch-Sh., Iyengar, R., Miller, R.J., Jan, L.Y., Lefkowitz, R.J. y Hamm, H.E. (1998) "Molecular Basis for Interactions of G Protein $\beta\gamma$ Subunits with Effectors" Science. 280:1271-1274pp.

Furray, C., Bard, J.A., Wetzel, J.M., Chiu, G., Shapiro, E., Tang, R., Lepor, H., Hartig, P.R., Weinshank, R.L., Branchek, T.A. y Gluchowski, Ch. (1994) "The α_1 -Adrenergic Receptor that Mediates Smooth Muscle Contraction in Human Prostate Has the Pharmacological Properties of the Cloned Human α_{1C} Subtype" Mol. Pharm. 45:703-708pp.

García-Sáinz, J.A., Romero-Avila, M.T., Hernández, R.A, Macías-Silva, M., Olivares-Reyes, A. y González-Espinosa, C. (1992) "Species heterogeneity of hepatic α 1-adrenoceptors: α 1A-, α 1B-, and α 1C-subtypes" Biochem. Biophys. Res. Commun. 186:760-767pp.

- García-Sáinz, J.A. (1995) "Adrenaline and its Receptors: One Hundred Years of Research" Arch. of Medical Res. 26(3):205-212pp.
- García-Sáinz, J.A., Romero-Avilla, M.T., Villalobos-Molina, R. y Minneman, K.P. (1995) " α_1 -adrenergic subtype selectivity of tamsulosin. Studies using liver from different species" Eur. J. Pharmacol. 289:1-7pp.
- García-Sáinz, J.A. (1996) Hormonas: Mensajeros químicos y comunicación celular. Fondo de Cultura Económica, Colección la ciencia desde México. 120 pág.
- García-Sáinz, J.A. y Torres-Padilla, M.E. (1999) "Modulation of basal intracellular calcium by inverse agonist and phorbol myristate acetate in rat-1 fibroblasts stably expressing α_{1D} -adrenoceptors" FEBS Letters. 443, 277-281pp.
- García-Sáinz, J.A., Gottfried-Blackmore, A., Vázquez-Prado, J. y Romero-Avilla, M.T. (1999) "Protein kinase C-mediated phosphorylation and desensitization of human α_{1B} -adrenoceptors" Eur. J. of Pharmacol. 385:263-271pp.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J. y Villalobos-Molina, R. (1999) " α_1 -Adrenoceptors: Subtypes, Signaling, and Roles in Health and Disease" Arch. of Medical Res. 30:449-458
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Prado, J. y Medina, L. del C. (2000) " α_1 -Adrenoceptors: function and phosphorylation" Eur. J. of Pharm. 389:1-12pp.
- García-Sáinz, J.A., Vázquez-Cuevas, F. y Romero-Ávila, M.T. (2001) "Phosphorylation and desensitization of α_{1D} -adrenergic receptors" Biochem. J. 353:603-610pp.
- Gisbert, R., Noguera, M.A., Ivorra, M.D. y D'ocón, P. (2000) "Functional Evidence of a Constitutively Active Population of α_{1D} -Adrenoceptors in Rat Aorta" The J. of Pharmacol. And Expr. Ther. 295(2):810-817pp.
- Goetz, A.S., King, H.K., Ward, S.D.C., True, T.A., Rimele, T.J. y Saussy, D.L. (1995) "BMY 7378 is a selective antagonist of the D subtype of α_1 -adrenoceptors" Eur. J. Pharmacol. 272:R5-R6pp.
- Gross, G., Hanft, G. y Rugevics, Ch. (1988) "5-Methyl-urapidil discriminates between subtypes of the α_1 -adrenoceptor" Eur. J. of Pharmacol. 151:333-335pp.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. y Tsien, R.Y. (1985) "A New Generation of Ca^{2+} Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties" The JBC. 260(6):3440-3450pp.
- Hadcock, J.R. y Malbon, C.C. (1993) "Agonist Regulation of Gene Expression of Adrenergic Receptors and G Proteins" J. of Neurochem., vol. 60, 1:1-8pp.

- Han, Ch., Abel, P.W. y Minneman K.P. (1987) "Heterogeneity of α_1 -Adrenergic Receptors Revealed by Chlorethylclonidine" *Mol. Pharm.* 32:505-510pp.
- Harada, K., Ohmori, M. y Fujimura, A. (1996) "Comparison of the antagonistic activity of tamsulosin and doxazosin at vascular α_1 -adrenoceptors in humans" *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 354:557-561pp.
- Hieble, J.P., Bylund, D.B., Clarke, D.E., Eikenburg, D.C., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P. y Ruffolo, R.R. (1995) "International Union of Pharmacology X. Recommendation for Nomenclature of α_1 -Adrenoceptors: Consensus Update" *Pharm. Rev.* 47 (2): 267-270pp.
- Horie, K., Obika, K., Foglar, R. y Tsujimoto, G. (1995) "Selectivity of imidazoline α -adrenoceptor agonists (oxymetazoline and cirazoline) for human cloned α -adrenoceptor subtypes" *Br. J. of Pharm.* 116:1611-1618pp.
- Huerta-Bahena, J., Villalobos-Molina, R. y García-Sáinz, J.A. (1982) "Cycloheximide: an adrenergic agent" *Life Science.* 30:1757-1762pp.
- Hur, E-M. y Kim, K-T. (2002) "G protein-coupled receptor signalling and cross-talk Achieving rapidity and specificity" *Cell. Signaling* 14:397-405pp.
- Hwa, J., Graham, R.M. y Perez, D.M. (1995) "Identification of Critical Determinants of α_1 -Adrenergic Receptor Subtype Selective Agonist Binding" *JBC.* 270(39):23189-23195pp.
- Ishiguro, M., Futabayashi, Y., Ohnuki, T., Ahmed, M., Muramatsu, I. y Nagatomo, T. (2002) "Identification of binding sites of prazosin, tamsulosin and KMD-3213 with α_1 -adrenergic receptor subtypes by molecular modeling" *Life Sciences.* 71:2531-2541pp.
- Klein, U., Muller, C., Chu, P., Birnbaumer, M. y Zastrow, M. (2001) "Heterologous Inhibition of G Protein-coupled Receptor Endocytosis Mediated by Receptor-specific Trafficking of β -Arrestins" *JBC.* 276(20):17442-17447pp.
- Kobilka, B. (1992) "Adrenergic Receptors as models for G protein-coupled receptors" *Ann. Rev. Neurosci.* 15:87-114pp
- Laduron, P.M. (1984) "Criteria for receptor sites in binding studies" *Biochemical Pharmacol.* 33(6):833-839pp.
- Lattion, A-L, Diviani, D. y Cotecchia, S. (1994) "Truncation of the Receptor Carboxyl Terminus Impairs Agonist-dependent Phosphorylation and Desensitization of the α_{1B} -Adrenergic Receptor". *JBC.* 269(36):22887-22893pp.
- Leeb-Lundberg, L.M., Cotecchia, S., Lomasney, J.W., DeBernardis, J.F., Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1985) "Phorbol esters promote α_1 -adrenergic

receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism" Proc. Natl. Acad. Sci., 82:5651-5655pp.

Liu, W.S. y Heckman, C.A. (1998) "The Sevenfold Way of PKC Regulation" Cell Signal. 10(8):529-542pp.

Lomasney, J. W. (1991) "Molecular biology of α -adrenergic receptors: implications for receptor classification and for structures-function relationships" Biochimica et Biophysica Acta. 1095, 127-139pp.

Lomasney, J. W., Cotecchia, S., Lorenz, W., Leung, W-Y., Scwinn, D.A., Yang-Feng, T.L., Brownstein, M., Lefkowitz, R.J. y Caron, M.G. (1991) "Molecular Cloning and Expression of the cDNA for the α_{1A} -Adrenergic Receptor" JBC. 266(10): 6365-6369pp.

McCune, D.F., Edelmann, S.E., Oleges, J.R, Post, G.R, Waldrop, B.A., Waugh, D.J.J., Perez, D.M. y Piascik, M.T. (2000) "Regulation of the Cellular Localization and Signaling Properties of the α_{1B} -and α_{1D} -Adrenoceptors by Agonists and Inverse Agonists" Mol. Pharmacol. 57: 659-666pp.

Melvin, I.S., Strathmann, M.P. y Gautam, N. (1991) "Diversity of G Proteins in Signal Transduction" Science. Vol.252, 802-808pp.

Michel, M.C. y Insel P.A. (1994) "Comparison of cloned and pharmacologically defined rat tissue α_1 -adrenoreceptor subtypes" Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.350:136-142pp.

Michel, M.C., Kenny, B. y Schwinn, D.A. (1995) "Classification of α_1 -adrenoreceptor subtypes" Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 352:1-10pp.

Neer, E.J. (1995) "Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals"Cell. Vol.80, 249-257pp.

Norman, J. y Litwack, G.(1997) Hormones. Ed. 2°. Academic Press.

Perez, D.M., Piascik, M.T. y Graham, R. B. (1991) "Solution-Phase Library Screening for the Identification of Rare Clones: Isolation of an α_{1D} -Adrenergic Receptor cDNA" Mol. Pharmacol., 40:876-883pp.

Perez, D.M., De Yung, M.B. y Graham, R. B. (1993) "Coupling of Expressed α_{1B} -and α_{1D} -Adrenergic Receptors to Multiple Signalin Pathways Is Both G Protein and Cell Type Specific" Mol. Pharmacol. 44:784-795pp.

Piascik, M.T., Guarino, R.D., Smith, M.S., Soltis, E.E., Saussy, D.L. y Perez, D.M. (1995) "The Specific Contribution of the Novel Alpha-1D Adrenoceptor to the Contraction of Vascular Smooth Muscle" The J. of Pharmacol. And Exp. Ther. 275(3):1583-1589pp.

Piasecik M.T. y Perez D. M. (2001) " α_1 -Adrenergic Receptors: New Insights and Directions" *The J. Of Pharmacol. and Expr. Ther.* 298(2):403-410pp.

Price, D.T., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Berkowitz, D. y Schwinn, D.A. (1994) "Localization of mRNA for Three Distinct α -Adrenergic Receptor Subtypes in Human Tissues: Implications for Human α -Adrenergic Physiology" *Mol.Pharm.* 45:171-175pp.

Price, D.T., Chari, R.S., Berkowitz, D.E., Meyers, W.C. y Schwinn, D.A. (1994) "Expression of α_1 -Adrenergic Receptor Subtype mRNA in Rat Tissues and Human SK-N-MC Neuronal Cells: Implications for α_1 -Adrenergic Receptor Subtype Classification" *Mol. Pharm.* 46: 221-226pp.

Pupo, A.S. y Minneman, K.P. (2002) "Interaction of neural nitric oxide synthase with α_1 -adrenergic receptor subtypes in transfected HEK-293 cells" *BMC Pharmacology.* 2(17):1-7pp.

Pupo, A.S., Uberti, M.A. y Minneman, K.P. (2003) "N-terminal truncation of human α_{1D} -adrenoceptors increases expression of binding sites but not protein" *Eur. J. of Pharm.* 462:1-8pp.

Rokosh, D. G. (1994) "Distribution of α_{1C} -Adrenergic Receptor mRNA in Adult Rat Tissues by RNase Protection Assay and Comparison with α_{1B} and α_{1D} . *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* 200(3):1177-1184pp.

Sawutz, D.G., Lanier, S.M., Warren, L. Ch. y Graham, R.M. (1987) "Glycosylation of the Mammalian α_1 -Adrenergic Receptor by Complex Type N-Linked Oligosaccharides" *Mol. Pharmacol.* 32:565-571pp.

Scmidt, M., Evellin, S., Weermink, P.A., Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W. y Jakobs, K.H. (2001) "A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase" *Nature Cell Biol.* 3:1020-1024pp.

Schwinn, D.A. y Lomasney, J.W. (1992) "Pharmacologic characterization of cloned α_1 -adrenoceptor subtypes: selective antagonists suggest the existence of a fourth subtype" *Eur. J. of Pharmacol.* 277:433-436pp.

Schwinn, D.A., Johnston, G.I., Page, S.O., Mosley, M.J., Wilson, K.H., Worman, N.P., Campbell, Sh., Fidock, M.D., Furness, L.M., Parry-Smith, D.J., Peter, B. y Bailey, D.S. (1995) "Cloning and Pharmacological Characterization of Human Alpha-1 Adrenergic Receptors: Sequence Corrections and Direct Comparison with Other Species Homologues" *JPET.* 272:134-142pp.

Schwinn, D.A. y Kwatra, M.M. (1998) " Expression and Regulation of α_1 -Adrenergic Receptors in Human Tissues" *Advances in Pharmacol.* 42:390-394pp.

Selbie. L.A. y Hill, S.J. (1998) "G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways" *TIPS.* 19:87-93pp.

Shinoura, H., Shibata, K., Hirasawa, A., Tanoue, A., Hashimoto, K. y Tsujimoto, G. (2002) "Key amino acids for differential coupling of α_1 -adrenergic receptor subtypes to Gs" BBRC. 299:142-147pp.

Small, K.M., McGraw, D.W. y Liggett, S.B. (2003) "Pharmacology and Physiology of Human Adrenergic Receptor Polymorphisms" Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43:381-411pp.

Strader, C.D., Fong, T.M., Tota, M.R., Uderwood, D. y Dixom, R.A.F. (1994) "Structure and function of G protein-coupled receptors" Annu. Rev. Biochem. 63:101-132pp.

Sutherland, E.W. (1972) "Studies on the Mechanism of Hormone Action" Science 177:401-408pp.

Suzuki, F., Miyamoto, S., Takita, M., Oshita, M., Watanabe, Y., Kakizuka, A., Narumiya, SH., Taniguchi, T. y Muramatsu, I. (1997) "Cloning, functional expression and tissue distribution of rabbit α_{1D} -adrenoceptor" BBA. 1323:6-11pp.

Taguchi, K., Yang, M., Goepel, M. y Michel, M.C. (1998) "Comparison of human α_1 -adrenoreceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways" Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 357:100:110pp.

Tanoue, A., Nasa, Y., Koshimizu, T., Shinoura, H., Oshikawa, S., Kawai, T., Sunada, S., Takeo, S. y Tsujimoto, G. (2002) "The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction" J. Clin. Invest. 109:765-775pp.

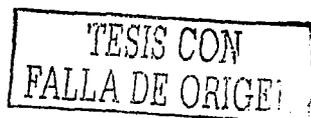
Tanoue, A., Koshimizu, T. y Tsujimoto, G. (2002) "Transgenic studies of α_1 -adrenergic receptor subtype function" Life Sciences. 71: 2207-2215pp.

Terman, B.I., Grodski, R.A., Hess, H.J. y Graham, R.M. (1990) "Identification and Structural Characterization of α -Adrenergic Receptor Subtypes" Mol. Pharm. 37:526-534pp.

Theroux, T.L., Esbenshade, T. A., Peavy, R.D. y Minneman, K.P. (1996) "Coupling Efficiencies of Human α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes: Titration of Receptors Density and Responsiveness with Inducible and Repressible Expression Vectors" Mol. Pharmacol. 50:1376-1387.

Vázquez-Prado, J. y García-Sáinz, J.A. (1996) "Effect of Phorbol Myristate Acetate on α_1 -Adrenergic Action in Cells Expressing Recombinant α_1 -Adrenoceptor Subtypes" Molecular Pharmacol. 50:17-22pp.

Vázquez-Prado, J., Medina, L.C., Romero-Avila, M.T., González-Espinosa, C. y García-Sáinz, J.A. (2000) "Norepinephrine-and Phorbol Ester-induced Phosphorylation of α_{1A} -Adrenergic Receptors" JBC. 275(9):6553-6559pp.



Vázquez-Prado, J., Casas-González, P. y García-Sáinz, J.A. (2003) "G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions" *Cellular Sig.* 15:549-557pp.

Weinberg, D.H., Trivedi, P., Tan, C.P., Mitra, S., Perkins-Barrow, A., Borkowski, D., Strader, C.D. y Bayne, M. (1994) "Cloning, expression and characterization of human α adrenergic receptors $\alpha 1A$, $\alpha 1B$ and $\alpha 1C$ " *BBRC* 201:1296-1304pp.

Wu, D., Katz, A., Lee, Ch-H. y Melvin, S.I. (1992) "Activation of Phospholipase C by α_1 -Adrenergic Receptors Is Mediated by the α Subunits of Gq Family" *JBC.* 267(36):25798-25802pp.

Yang-Feng, M.L., Xue, F., Zhong, W., Cotecchia, S., Frielle, T., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. y Francke, U. (1990) "Chromosomal organization of adrenergic receptor genes" *PNAS.* 87:1516-1520pp.

Yazawa, H.M., Takanashi, M., Sudoh, K., Inagaki, O. Y Honda, K. (1992) "Characterization of methoxy-benzenesulfonamide HCl, a potent and selective α_1 -adrenoceptor radioligand" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263:201- pp.

Yang, M., Ruan, J., Voller, M., Schalken, J. y Michel, M.C. (1999) "Differential regulation of human α_1 -adrenoceptor subtypes" *NSAP* 359:439-446pp.

Zhao, M., Hwa, J. y Perez, D. (1996) "Identification of Critical Extracellular Loop Residues Involved in $\alpha 1$ -Adrenergic Receptor Subtype-Selective Antagonist Binding" *Mol. Pharmacol.* 50:1118-1126pp.

Zhong, H. y Minneman, K.P. (1999) " α_1 -Adrenoceptor subtypes" *Eur. J of Pharm.* 375:261-276pp.

Zhong, H. y Minneman, K.P. (1999) "Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in PC12 Cells by Closely Related α_1 -Adrenergic Receptor Subtypes" *J. of Neurochemistry.* 72:2388-2396pp.

